СБОРНИК МЕЖДУНАРОДНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ВИН И СУСЕЛ

МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ВИНОГРАДАРСТВА И ВИНОДЕЛИЯ

МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВИНОГРАДАРСТВА И ВИНОДЕЛИЯ

СБОРНИК МЕЖДУНАРОДНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ВИН И СУСЕЛ

Издание 2022 ***<u>ТОМ 1</u>***

ВКЛЮЧАЕТ :
Резолюции, принятые на 62 Генеральной Ассамблее
6 июля 2021 в Париже (Франция)

МОВВ - 35 Ул. Монсо, 75008 ПАРИЖ

Издано в Париже (Франция)

35, ул. Монсо

75008 Париж, Франция

Обязательный экземпляр : Август 2021

ISBN : 978-2-85038-127-0

ISBN Том I : 978-2-85038-128-7

Общая структура сборника

Содержание
Предисловие
ПРИЛОЖЕНИЕ A – МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВИН И СУСЕЛ

РАЗДЕЛ 1 – ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

РАЗДЕЛ 2 – ФИЗИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

РАЗДЕЛ 3 – ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

РАЗДЕЛ 3.1 – ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

РАЗДЕЛ 3.1.1 – САХАРА
РАЗДЕЛ 3.1.2 – СПИРТЫ
РАЗДЕЛ 3.1.3 – КИСЛОТЫ
РАЗДЕЛ 3.1.4 – ГАЗЫ
РАЗДЕЛ 3.1.5 – ДРУГИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ
РАЗДЕЛ 3.1.6 – МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

РАЗДЕЛ 3.2 – НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

РАЗДЕЛ 3.2.1 - АНИОНЫ

РАЗДЕЛ 3.2.2 - КАТИОНЫ

РАЗДЕЛ 3.2.3 – ДРУГИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

РАЗДЕЛ 4 – МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

РАЗДЕЛ 5 – ДРУГИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

ПРИЛОЖЕНИЕ B – СЕРТИФИКАТЫ АНАЛИЗА

ПРИЛОЖЕНИЕ C – МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ ПРЕДЕЛЫ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ

ПРИЛОЖЕНИЕ D – РЕКОМЕНДАЦИИ

ПРИЛОЖЕНИЕ E – ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ПРИЛОЖЕНИЕ F – СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВИНОГРАДНОГО САХАРА (РЕКТИФИЦИОРОВАННОГО КОНЦЕНТРИРОВАННОГО СУСЛА)

ПРИМЕЧАНИЕ: Каждый метод имеет свои ссылки в скобках (упомянутые резолюции, базовые методы "Сборник международных методов анализа вин и сусел" 1990 = Сборник МОВВ изд. 1990; методы "Сборника международных методов анализа вин" 1978 = A + цифра, т. е. Al, A2 ...)

Заголовок	Ссылка	Тип метода
- Содержание	OIV-MA-INT-00	

ТОМ 1

- Предисловие	OIV-MA-INT-01	
- Схема и формулировка метода анализа МОВВ		

ПРИЛОЖЕНИЕ A – МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВИН И СУСЕЛ

РАЗДЕЛ 1 – ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

- Общие положения	OIV-MA-AS1-02	
- Классификация методов анализа (oeno 9/2000)	OIV-MA-AS1-03	
- Матричный эффект при анализе содержания металлов (oeno 5/2000)	OIV-MA-AS1-04	
- Положения об использовании запатентованных методов, которые должны быть приняты МОВВ	OIV-MA-AS1-05a	
РАЗДЕЛ 2 – ФИЗИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ		
- Плотность и удельный вес при 20°C (A 1 в редакции 601A/2021)	OIV-MA-AS2-01	I и IV
- Оценка путем рефрактометрии концентрации сахара в винограде, сусле, концентрированном виноградном сусле и ректификованном концентрированном виноградном сусле (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS2-02	I
- Общий сухой экстракт (гравиметрия) (A 3 в редакции 377/2009 и 387/2009)	OIV-MA-AS2-03A	I

- Общий сухой экстракт (денсиметрия) (в редакции 465//2012)	OIV-MA-AS2-03B	IV
- Зола (A 6 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS2-04	I
- Щелочность золы (A 7 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS2-05	IV
- Окислительно-восстановительный потенциал (Oeno 3/2000)	OIV-MA-AS2-06	IV
- Хроматические характеристики (A0 изм.)	OIV-MA-AS2-07A	Исключен
- Хроматические характеристики (A0 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS2-07B	IV
- Мутность вина (Oeno 4/2000 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS2-08	IV
- Метод изотопного соотношения $^{18}O/^{16}O$ (Oeno 2/96)	OIV-MA-AS2-09	Исключен
- Индекс Фолина-Чокальтеу (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS2-10	IV
- Хроматические характеристики (Oeno 1/2006)	OIV-MA-AS2-11	I
- Метод определения соотношения изотопов $^{18}O/^{16}O$ воды в винах и сусле (Oeno 353/2009	OIV-MA-AS2-12	II
- Метод определения размера кусков дубовой древесины путем просеивания (Oeno 406-2011)	OIV-MA-AS2-13	I

РАЗДЕЛ 3 – ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

РАЗДЕЛ 3.1 – ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

РАЗДЕЛ 3.1.1 - САХАРА

- Редуцирующие вещества (A 4 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS311-01A	IV
- Редуцирующие сахара (осветление) (тип IV)	OIV-MA-AS311-01B	Исключен
- Редуцирующие сахара (титриметрия) (тип II)	OIV-MA-AS311-01C	Исключен
- Глюкоза и фруктоза (ферментативный метод) (в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS311-02	II
- Дозирование сахаров по ВЭЖХ (Oeno 23/2003)	OIV-MA-AS311-03	II
- Стабилизация сусел для обнаружения добавления сахарозы (A 5)	OIV-MA-AS311-04	
- Определение распределения дейтерия в этаноле, полученного путем ферментации виноградного сусла, концентрированного виноградного сусла, ректифицированного виноградного сусла и вин с применением ядерного магнитного резонанса (SNIF-NMR/ RMN-FINS) (Oeno 426-2011)	OIV-MA-AS311-05	II
- Полиолы, получаемые из сахаров (Oeno 9/2006)	OIV-MA-AS311-06	IV
- Глюкоза и фруктоза (pH-метрия) (Oeno 10/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS311-07	III
- Глюкоза, фруктоза и сахароза (pH-метрия) (Oeno 11/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS311-08	IV

- Определение соотношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в глюкозе, фруктозе, глицерине, этаноле в продуктах виноградного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией соотношения изотопов	OIV-MA-AS311-09	II и III
- Определение D-глюкозы и D-фруктозы в винах автоматизированным ферментативным методом (Oeno 600/2018)	OIV-MA-AS311-10	III
РАЗДЕЛ 3.1.2 - СПИРТЫ		
Определение крепости спирта по объёму (A2; 8/2000; 24/2003; в редакции 377/2009; в редакции 601B/2021)	OIV-MA-AS312-01	I и IV
- Таблицы поправок (A2)	OIV-MA-AS312-02	IV
- Метанол (GC) (ГХ) (A 41 в редакции 480/2014)	OIV-MA-AS312-03A	IV
- Метанол (колориметрия) (A 41 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS312-03B	IV
- Глицерин и 2,3-бутандиол (A 21 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS312-04	IV
- Глицерин (ферментативный метод) (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS312-05	
- Определение соотношения изотопов этанола (Oeno 17/2001)	OIV-MA-AS312-06	II
- Глицерин (метод GC-C-IRMS (газовая хромато-масс-спектрометрия) или метод HPLC-IRMS) (масс-спектрометрии изотопных соотношений - жидкостная хроматография высокого давления ЖХВД) (МОВВ- Oeno 343-2010)	OIV-MA-AS312-07	IV
РАЗДЕЛ 3.1.3 - КИСЛОТЫ		
- Общая кислотность (в редакции 551/2015)	OIV-MA-AS313-01	I
- Летучая кислотность (в редакции 549/2015)	OIV-MA-AS313-02	I
- Фиксированная кислотность (A 11 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-03	I
- Органические кислоты (HPLC) (ВЭЖХ) (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-04	IV
- Винная кислота (гравиметрия) (A 12 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-05A	IV
- Винная кислота (колориметрия) (A 12)	OIV-MA-AS313-05B	Исключен
- Молочная кислота – химический метод (A 27)	OIV-MA-AS313-06	Исключен
- Молочная кислота – ферментативный метод (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-07	II
- Лимонная кислота - химический метод (A 29)	OIV-MA-AS313-08	IV
- Лимонная кислота - ферментативный метод (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-09	II
- Общая яблочная кислота (A 33 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-10	IV
- L-яблочная кислота: ферментативный метод (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-11	II
- D-яблочная кислота: ферментативный метод (Oeno 6/98 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-12A	II

- D-яблочная кислота: ферментативный метод (низкая концентрация) (Oeno 16/2002 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-12B	IV
- L-аскорбиновая кислота (спектрофлуориметрия) (A 28 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-13A	IV
- L-аскорбиновая кислота (спектрофлуориметрия) (A 28)	OIV-MA-AS313-13B	Исключен
- Сорбиновая кислота (спектрофлуориметрия) (A 30 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-14A	IV
- Сорбиновая кислота (GC (газовая хроматография) (A 30 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-14B	IV
- Сорбиновая кислота (TLC (ТСХ (тонкослойная хроматография) (A 30 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS313-14C	IV
- pH (A31 в редакции Oeno 438-2011)	OIV-MA-AS313-15	I
- Органическая кислота : ионная хроматография (Oeno 23/2004)	OIV-MA-AS313-16	IV
- Шикимовая кислота (Oeno 33/2004)	OIV-MA-AS313-17	II
- Сорбиновая кислота (капиллярный электрофорез) (Oeno 4/2006)	OIV-MA-AS313-18	IV
- Органические кислоты и сульфаты (капиллярный электрофорез) (Oeno 5/2006 и Oeno 407-2011)	OIV-MA-AS313-19	III
- Сорбиновые, бензойные, салициловые кислоты (Oeno 6/2006)	OIV-MA-AS313-20	IV
- Метавинная кислота (Oeno 10/2007)	OIV-MA-AS313-21	IV
- - Определение L-аскорбиновой кислоты и D-изо-аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ (Oeno 11/2008)	OIV-MA-AS313-22	II
- Идентификация L-винной кислоты (Oeno 12/2008)	OIV-MA-AS313-23	IV
- Определение общего этанола в вине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Oeno 595/2018)	OIV-MA-AS313-24	IV
- Определение L-молочной кислоты в винах автоматизированным ферментативным методом (Oeno 599/2018)	OIV-MA-AS313-25	IV
- Определение L-яблочной кислоты в винах автоматизированным ферментативным методом (Oeno 599-2018)	OIV-MA-AS313-26	III
- Определение уксусной кислоты в винах автоматизированным ферментативным методом (Oeno 621-2019)	OIV-MA-AS313-27	II
- Определение D-глюконовой кислоты в винах и суслах автоматизированным ферментативным методом	OIV-MA-AS313-28	II
РАЗДЕЛ 3.1.4 - ГАЗЫ		
- Углекислый газ (A 39 изменен oeno 21/2003 и дополнен 3/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS314-01	II
- Измерение избыточного давления игристых вин (Oeno 21/2003)	OIV-MA-AS314-02	I
- Определение соотношения изотопов углерода ^{13}C /^{12}C CO2 в игристых винах (Oeno 7/2005)	OIV-MA-AS314-03	II

- Углекислый газ (манометрический метод) (oeno 2/2006)	OIV-MA-AS314-04	II

ТОМ 2

РАЗДЕЛ 3.1.5 - ДРУГИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

- Ацетальдегид (A 37 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-01	IV
- Этилацетат (газовая хроматография) (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-02A	IV
- Этилацетат (титриметрия) (в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-02B	IV
- Мальвидин диглюкозид (A 18 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-03	IV
- Этилуретан (oeno 8/98 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-04	II
- - Гидроксиметилфурфурол (колориметрия) (A 19 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-05A	IV
- - Гидроксиметилфурфурол (ВЭЖХ) (A 19 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-05B	IV
- Производные цианида (Oeno 4/94 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-06	II
- Искусственные подсластители (ТСХ: сахарин, цикламат, дульцин и P-4000) (A 36 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-07A	IV
- Искусственные подсластители (ТСХ: сахарин, цикламат, дульцин) (A 36 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-07B	IV
- Искусственные красители (A 43 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-08	IV
- Диэтиленгликоль (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS315-09	IV
- Охратоксин A (Oeno 16/2001 в редакции 349-2011)	OIV-MA-AS315-10	II
- ЖХВД-определение девяти основных антоцианов в красных и розовых винах (Oeno 22/2003; Oeno 12/2007)	OIV-MA-AS315-11	II
- Растительные белки (Oeno 24/2004)	OIV-MA-AS315-12	IV
- Полихлорфенолы, полихлоранизолы (Oeno 8/2006)	OIV-MA-AS315-13	Исключен
- Определение лизоцима с помощью ЖХВД (Oeno 8/2007)	OIV-MA-AS315-14	IV
- Определение 3-метоксипропана-1,2-диола и циклических диглицеролов (Oeno 11/2007)	OIV-MA-AS315-15	II
- Определение высвобождаемого 2,4,6-трихлоранизола в вине (Oeno 296/2009)	OIV-MA-AS315-16	IV
- Определение наличия и содержания полихлорфенолов и полихлоранизолов в винах, пробках, древесине и бентонитах, используемых в качестве атмосферных ловушек (Oeno 374/2009)	OIV-MA-AS315-17	IV
Анализ биогенных аминов в сусле и винах (ЖХВД) (Oeno 346/2009)	OIV-MA-AS315-18	II
- Определение глутатиона (Oeno 345/2009)	OIV-MA-AS315-19	IV
- Определение α -дикарбонильных соединений вина методом ЖХВД после дериватизации (Oeno 386A-2010)	OIV-MA-AS315-20	IV
- Определение α-дикарбонильных соединений вина методом ГХ после дериватизации (Oeno 386B-2010)	OIV-MA-AS315-21	IV
- Определение карбоксиметилцеллюлозы в белых винах (Oeno 404-2010)	OIV-MA-AS315-22	IV

- Количественная оценка потенциально аллергенных остатков белковых оклеивающих веществ в вине (Oeno 427-2010)	OIV-MA-AS315-23	критерии
- Определение лизоцима в вине методом высокоэффективного капиллярного электрофореза (Oeno 385-2012)	OIV-MA-AS315-24	IV
- Определение лизоцима в вине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	OIV-MA-AS315-25	IV
- Метод определения биогенных аминов в вине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с фотодиодом	OIV-MA-AS315-26	IV
- Анализ летучих соединений в винах методом газовой хроматографии	OIV-MA-AS315-27	IV
- Метод определения 1,2-пропандиола и 2,3-бутандиола	OIV-MA-AS315-28	IV
- Обнаружение хитиназы и тауматин-подобных белков в белых винах	OIV-MA-AS315-29	IV
- Определение алкилфенолов в винах методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС или ГХ-МС /МС)	OIV-MA-AS315-30	IV
- Качественное определение подсластителей в вине методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) (МОВВ-OENO 636-2021)	OIV-MA-AS315-31	IV
РАЗДЕЛ 3.1.5 - МНОГОЭЛЕМЕНТНЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ		
- Количественное определение глюкозы, яблочной кислоты, уксусной кислоты, фумаровой кислоты, шикимовой кислоты и сорбиновой кислоты в вине с использованием количественной спектрометрии ядерного магнитного резонанса ([1] ЯМР высокого разрешения)	*OIV-MA-AS316-01*	*IV*
РАЗДЕЛ 3.2 - НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ		
РАЗДЕЛ 3.2.1 - АНИОНЫ		
- Общее содержание бромида (A 23 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS321-01	IV
- Хлориды (A 15 в редакции 377/2009)	OIV-MA-SA321-02	II
- Фториды (A 22; Oeno 22/2004)	OIV-MA-AS321-03	II
- Общее содержание фосфора (A 16 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS321-04	IV
- Сульфаты (гравиметрия) (A 14 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS321-05A	II
- Сульфаты (титриметрия) (A 14)	OIV-MA-AS321-05B	Исключен
РАЗДЕЛ 3.2.2 - КАТИОНЫ		
- Аммоний (A 20 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-01	IV
- Калий (ААС / атомная абсорбционная спектрофотометрия) (A 8 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-02A	II
- Калий (эмиссионная фотометрия) (A 8 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-02B	III
- Калий (гравиметрия) (A 8)	OIV-MA-AS322-02C	Исключен
- Натрий (ААС) (A 25 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-	II

- Натрий (эмиссионная фотометрия) (A 25 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-	III
- Кальций (A 26 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-04	II
- Железо (ААС) (A 9 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-	IV
- Железо (колориметрия) (A 9 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-	IV
- Медь (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-06	IV
- Магний (A 26)	OIV-MA-AS322-07	II
- Цинк (A 45)	OIV-MA-AS322-08	IV
- Серебро (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-09	IV
- Кадмий (Сборник МОВВ изд. 1990 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS322-10	IV
- Свинец	OIV-MA-AS322-11	Исключен
- Свинец (критерии методов) (Oeno 7/2006)	OIV-MA-AS322-12	II
Анализ минеральных элементов в винах с помощью ИСП-АЭС (атомно-эмиссионная спектрометрия с индукционно связанной плазмой) (Oeno 478/2013)		
РАЗДЕЛ 3.2.3 - ДРУГИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ	OIV-MA-AS322-13	III
- Мышьяк (ААС) (Oeno 14/2002 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS323-	IV
- Мышьяк (ААС) (A 34 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS323-	IV
- Мышьяк (колориметрия) (A 34)	OIV-MA-AS323-	Исключен
- Общий азот – метод Дюма (Oeno 13/2002 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS323-02A	II
- Общий азот - (A 40 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS323-	IV
- Бор (A 44 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS323-03	IV
- Свободный диоксид серы (титриметрия) (A 17 в редакции 377/2009, 591A/2018 и 661/2021)	OIV-MA-AS323-04A1	IV
- Общий диоксид серы (титриметрия) (A 17 в редакции 377/2009, 591A/2018 и 661/2021)	OIV-MA-AS323-04A2	II
- Диоксид серы (йодометрия) (A17 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS323-	IV
- Диоксид серы (молекулярный метод) (A17 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS323-04C	IV
- Ртуть - атомная флуоресценция (Oeno 15/2002 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS323-06	IV
- Многоэлементный анализ с использованием ИСП-МС (МОВВ - Oeno 344-2010)	OIV-MA-AS323-07	II
- Анализ остатков пестицидов в вине после экстракции методом QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe - Быстрый, Простой, Дешевый, Эффективный, Точный и Надежный) (Oeno 436/2012)	OIV-MA-AS323-08	II
- Определение натамицина в винах (Oeno 461/2012)	OIV-MA-AS323-09	IV
- Метод определения фталатов в винах посредством ГХ-МС (Oeno 477/2013 в редакции Oeno 596/2019)	OIV-MA-AS323-10	II/IV
- Метод определения полиаспартата калия в вине с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с флуоресцентным детектором (МОВВ - OENO 6192019)	OIV-MA-AS323-11	IV
- Одновременный анализ железа, меди, калия, кальция		

Одновременный анализ содержания железа, меди, калия, кальция и марганца в винах с использованием МП/АЭС (атомно-эмиссионная спектрометрия с индуцированным микроволновым излучением плазмы) (МОВВ- OENO 637-2021)	OIV-MA-AS323-12	IV
РАЗДЕЛ 4 - МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ		
- Микробиологический анализ (Oeno 206-2010)	OIV-MA-AS4-01	IV
- Обнаружение консервирующих веществ и ингибиторов брожения (Тест на ферментируемость) (A35; Oeno 6/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS4-02A	IV
- Обнаружение консервирующих веществ и ингибиторов брожения (Обнаружение следующих кислот: сорбиновой, бензойной, *p*-хлорбензойной, салициловой, *p*-оксибензойной и ее эфиров) (A35; Oeno 6/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS4-02B	IV
- Обнаружение консервирующих веществ и ингибиторов брожения (Обнаружение производных моногалогенов уксусной кислоты) (A35; Oeno 6/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS4-02C	IV
- Обнаружение консервирующих веществ и ингибиторов брожения (определение этилпирокарбоната) (A35; Oeno 6/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS4-02D	IV
- Обнаружение консервирующих веществ и ингибиторов брожения (Исследование дегидроуксусной кислоты) (A35; Oeno 6/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS4-02E	IV
- Обнаружение консервирующих веществ и ингибиторов брожения (Азид натрия, ЖХВД) (A35; Oeno 6/2006 в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS4-02F	IV
- Перечислениие дрожжей вида *Brettanomyces bruxellensis* с помощью количественной ПЦР (qPCR) (Oeno 414-2011)		
РАЗДЕЛ 5 – ДРУГИЕ ВИДЫ АНАЛИЗА		
- Дифференциация крепленого сусла и сладких крепленых вин (в редакции 377/2009)	OIV-MA-AS4-03	IV
ПРИЛОЖЕНИЕ B – СЕРТИФИКАТЫ АНАЛИЗА	**OIV-MA-AS5-01**	
- Правила применения аналитических методов	OIV-MA-B1-01	
- Сертификаты анализа	OIV-MA-B1-02	
ПРИЛОЖЕНИЕ C – МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМЫМИ ПРЕДЕЛАМИ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ		
- Максимально допустимые пределы содержания различных веществ в вине	OIV-MA-C1-01	

ПРИЛОЖЕНИЕ D – РЕКОМЕНДАЦИИ

- Глюконовая кислота (oeno 4/91)	OIV-MA-D1-01
- Характеристика вин, полученных в результате избыточного прессования (Oeno 5/91)	OIV-MA-D1-02
- Уровень ионов натрия и хлоридов в винах (Oeno 6/91)	OIV-MA-D1-03

ПРИЛОЖЕНИЕ E - ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Принцип валидации (Oeno 7/98)	OIV-MA-AS1-05
- Совместное исследование	OIV-MA-AS1-07
- Прецзионность методов (Oeno 5/99)	OIV-MA-AS1-08
- Протокол для разработки, проведения и интерпретации результатов совместных исследований (Oeno 6/2000)	OIV-MA-AS1-09

Предел обнаружения и предел количественного определения метода анализа (Oeno 7/2000)	OIV-MA-AS1-10	
Единые правила внутреннего контроля качества в лабораториях аналитической химии (Oeno 19/2002)	OIV-MA-AS1-11	
- Практическое руководство по валидации (Oeno 10/05)	OIV-MA-AS1-12	
Рекомендации по валидации в одной лаборатории (Oeno 8/05)	OIV-MA-AS1-13	
Рекомендации по оценке неопределённости измерений (Oeno 9/05)	OIV-MA-AS1-14	
- Рекомендации, касающиеся норм стоимости	OIV-MA-AS1-15	
ПРИЛОЖЕНИЕ F - СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВИНОГРАДНОГО САХАРА (КОНЦЕНТРИРОВАННОГО РЕКТИФИРОВАННОГО СУСЛА)		
- Проводимость (Oeno 419A-2011)	OIV-MA-F1-01	IV
- Гидроксиметилфурфурал (ГМФ) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Oeno 419A-201)	OIV-MA-F1-02	IV
- Расчет фактического содержания алкоголя или объемной доли спирта в концентрированном сусле и виноградном сахаре (или ректифицированном концентрированном сусле) (Oeno 419A-2011)	OIV-MA-F1-03	IV
- Сахароза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Oeno 419A-2011)	OIV-MA-F1-04	IV
- Общая кислотность (Oeno 419A-2011)	OIV-MA-F1-05	IV
- pH показатель (Oeno 419A-2011)	OIV-MA-F1-06	IV
- Диоксид серы (Oeno 419A-2011)	OIV-MA-F1-07	IV
- Хроматические свойства (Oeno 419A-2011)	OIV-MA-F1-08	IV
- Общее содержание катионов (Oeno 419B-2012)	OIV-MA-F1-09	I
- Тяжелые металлы по ЭТААС (Электротермическая атомно-	OIV-MA-F1-10	IV

абсорбционная спектроскопия) (Oeno 419B-2012)		
- Тяжелые металлы по ИСП-МС (Oeno 419B-2012)	OIV-MA-F1-11	IV
- Определение мезо-инозитола, сцилло-инозитола и сахарозы	OIV-MA-F1-12	II
- Индекс Фолина Чокальтеу	OIV-MA-F1-13	IV

Предисловие

Сборник международных методов анализа и оценки вин и сусел был впервые опубликован в 1962 году и переиздан в 1965, 1972, 1978, 1990 и 2000 годах; каждый раз он включал дополнительные материалы, одобренные Генеральной Ассамблеей и ежегодно выпускаемые Подкомиссией по методам анализа.

Настоящее издание *Сборника международных методов анализа и оценки вин и сусел* включает все материалы, одобренные Генеральной Ассамблеей представителей правительств стран-членов МОВВ, редактированные и дополненные с 2000 г.

Сборник играет важную роль в согласовании методов анализа. Многие винодельческие страны включили определения и методы сборника в свои правила.

Согласно Регламенту (ЕС) № 479/2008, *методы анализа для установления состава продуктов, упомянутых в указанном Регламенте, и правила проверки того, подвергались ли эти продукты обработке в нарушение разрешенной энологической практики, являются методами, рекомендованными и опубликованными МОВВ в Сборнике международных методов анализа и оценки вин и сусел.* В целях обеспечения большей прозрачности Регламент (ЕС) № 606/2009 постановил опубликовать в общеевропейском масштабе (Серия С *Официального журнала Европейского Союза*) список и описание методов анализа, описанных в Сборнике международных методов анализа и оценки вин и сусел Международной организации виноградарства и виноделия, применяемые для контроля продукции виноградарства и виноделия.
Европейский Союз признает все методы, включенные в Сборник, и делает их обязательными для всех государств-членов, подтверждая тесное сотрудничество, установленное между ЕС и МОВВ.

Таким образом, благодаря своей ведущей роли в гармонизации методов анализа Сборник способствует упрощению международной торговли. Вместе с *Международным кодексом энологической практики* и *Международным энологическим кодексом* он представляет собой свод значительных научных, юридических и практических результатов.

Структура и терминология метода анализа МОВВ

Выдержка из стандарта ISO 78-2:1999

1. **Заголовок**
2. **Введение**
   Опционально
3. **Область применения**
   В данном разделе должен быть кратко указан метод химического анализа и, в частности, продукция, к которой он применяется.
4. **Определение метода**
5. **Сущность метода**
   Данный факультативный раздел указывает основные этапы используемого метода, а также основные принципы.
6. **Реактивы и материалы**
   В данном разделе должны быть перечислены все реагенты и материалы, использованные во время испытания, вместе с их основными характеристиками и, при необходимости, указана степень их чистоты.
   Указываются:
   Продукты, используемые в их коммерчески доступной форме
   Растворы определенной концентрации
   Рабочий раствор
   Типовой эталонный раствор
   Контрольный раствор
   Раствор сравнения
   Примечание: каждый купленный или приготовленный реагент должен быть указан с красной строки под конкретным справочным номером.

7. **Используемая аппаратура**
   В данном разделе должны быть перечислены наименования и основные характеристики всех приборов и оборудования, которые будут использоваться во время анализа или испытания.

8. **Отбор проб (Подготовка пробы)**
   Указываются:
   Процедура отбора проб
   Подготовка тестового образца
9. **Проведение исследования**
   Каждая операция должна быть описана однозначно и кратко.
   Данный раздел обычно включает следующие подпункты:
   Часть образца для анализа (данный подпункт должен содержать всю информацию, необходимую для приготовления части образца для анализа из пробного образца).
   Определение(я) или анализ(ы)/испытание(я) (данный подпункт должен

быть описан точно с целью облегчить описание, понимание и применение процедуры).

Калибровка (сопоставление с эталонными значениями) (при необходимости).

10. Расчет (результаты)

В данном разделе должен быть указан метод расчета результатов. Должны быть уточнены единицы измерения, используемое уравнение, значения алгебраических символов, количество знаков после запятой, до которых должны быть приведены результаты.

11. Прецизионность (при межлабораторной валидации)

Должны быть указаны следующие данные о прецизионности измерений:

Количество лабораторий

Среднее значение концентрации

Повторяемость (сходимость) и воспроизводимость результатов

Стандартное отклонение повторяемости и воспроизводимости

Ссылка на документ, содержащий опубликованные результаты межлабораторных испытаний.

12. Приложение

Приложение, касающееся положений о прецизионности измерений

Приложение, касающееся статистических и других данных, полученных по результатам межлабораторных испытаний.

13. Библиография

Приложение, касающееся положений о прецизионности

В данном приложении должны быть указаны, в частности,

- Степень повторяемости
- Степень воспроизводимости

Приложение, касающееся статистических и других данных, полученных из результатов межлабораторных испытаний.

Статистические и другие данные, полученные по результатам межлабораторных испытаний, могут быть приведены в информационном приложении.

Пример таблицы со статистическими результатами

Идентификация образца	**A**	**B**	**C**
Количество участвующих лабораторий			
Количество принятых результатов испытаний			
Средние значения (г/100 г образца)			
Истинное или принятое значение (г/100 г)			
Стандартное отклонение повторяемости (S_r)			

Коэффициент вариации повторяемости			
Предел повторяемости (r) (2,8 x S_r)			
Стандартное отклонение воспроизводимости			
Коэффициент вариации воспроизводимости			
Предел воспроизводимости (R) (2,8 x S_R)			

Может не считаться необходимым включать все данные, показанные в таблице; тем не менее рекомендуется включить, по крайней мере, следующие данные:

- Количество лабораторий
- Среднее значение концентрации
- Стандартное отклонение повторяемости
- Стандартное отклонение воспроизводимости
- Ссылка на документ, содержащий опубликованные результаты межлабораторных испытаний.

Приложение А

Методы анализа вин и сусел

OIV-MA-ANNEX-A

Общие замечания

1/ Чистое вино или сусло должны использоваться для химического и физического анализа. Если вино или сусло мутные, их сначала фильтруют через фильтровальную бумагу в закрытой воронке или центрифугируют в закрытой емкости. Эта операция должна быть указана во всех необходимых документах.

2/ Ссылка на метод, используемый для каждого анализа, должна присутствовать в любой требуемой документации.

3/ Единицы измерения различных величин (объем, масса, концентрация, температура, давление и т. д.) должны соответствовать рекомендациям ИЮПАК (Международный союз теоретической и прикладной химии).

4/ В отношении используемых реагентов и растворов для титрования, если в тексте не указано иное, используемые химические вещества должны быть «ч. д. а.», а вода должна быть дистиллированной или эквивалентной чистоты.

5/ Ферментные методы и определение ряда параметров должны основываться на абсолютных измерениях оптической плотности, что требует калибровки спектрофотометров по длинам волн и оптической плотности. Длина волны может быть откалибрована с использованием линий Hg: 239.94, 248.0, 253.65, 280.4, 302.25, 313.16, 334.15, 365.43, 404.66, 435.83, 546.07, 578.0 и 1014.0 нм. Поглощение можно откалибровать с помощью коммерческих эталонных растворов, полученных от подходящих поставщиков, или фильтров нейтральной плотности.

6/ Даны необходимые библиографические ссылки. Ссылки на рабочие документы Подкомиссии имеют пометку «*F.V., O.I.V.*». («зеленые страницы» / feuillets verts (фр.) или green pages (англ.)), за которыми следуют год публикации и номер документа.

Классификация аналитических методов
(Резолюция Oeno 9/2000)

КАТЕГОРИЯ I* (БЕНЧМАРКИНГ (ЭТАЛОННОЕ ОЦЕНИВАНИЕ): Метод, определяющий значение, которое может быть получено только путем применения метода как такового и который по определению служит единственным методом для установления приемлемого значения измеряемого параметра (например, спиртометрический состав, общая кислотность, летучая кислотность).

КАТЕГОРИЯ II* (СТАНДАРТНЫЙ МЕТОД): Метод категории II обозначается как эталонный метод в тех случаях, когда нельзя использовать методы категории I. Его следует выбирать из методов категории III (как определено ниже). Такие методы следует рекомендовать для использования в случае возникновения споров и в целях калибровки (например, калий, лимонная кислота).

КАТЕГОРИЯ III* (УТВЕРЖДЕННЫЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ): Метод категории III соответствует всем критериям, указанным Подкомиссией по методам анализа, и используется в целях мониторинга, проверки и регулирования (например, ферментативное определение глюкозы и фруктозы).

КАТЕГОРИЯ IV (ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ МЕТОД): Метод категории IV представляет собой традиционный или недавно применяемый метод, в отношении которого Подкомиссия по методам анализа еще не определила необходимые критерии (например, анализ синтезированных красителей, измерение окислительно-восстановительного потенциала).

* Методы, требующие официального одобрения в соответствии с процедурами, действующими в Подкомиссии по методам анализа.

Эффект матрицы для анализа содержания металлов методом атомной абсорбции

Матричный эффект для анализа содержания металлов с помощью атомной абсорбции

(Резолюция Oeno 5/2000)

ГЕНЕРАЛЬНАЯ АССАМБЛЕЯ,

В соответствии с пунктом 4 статьи 5 Международной конвенции по стандартизации методов анализа и оценки вин от 13 октября 1954 г.,

В рамках действий, связанных с предложениями Подкомиссии по международным методам анализа и оценки вин,

ПРИНИМАЯ ВО ВНИМАНИЕ, что методы, описанные в Сборнике международных методов анализа вин и сусел и подразумевающие использование эталонных растворов, применимы к сухим винам:

ОБРАЩАЕТ внимание пользователей на то, что отклонения могут наблюдаться и в других случаях, связанных с присутствием сахаров или производных сахаров,

ПОСТАНОВЛЯЕТ, что в этой связи необходимо проводить анализы с использованием метода количественных добавок. Следует использовать не менее трех аликвотных порций образца, содержащих различные добавки.

ПОСТАНОВЛЯЕТ дополнить методы анализа металлов (железа, свинца, цинка, серебра, кадмия) и мышьяка описанием методики количественных добавок, когда этого требует матричный эффект.

Положения об использовании запатентованных методов, которые должны быть приняты МОВВ

(Резолюция OIV-OENO 526-2016)

Определение патентованного метода анализа

В контексте деятельности МОВВ «запатентованный метод анализа» — это метод, либо содержащий интеллектуальную собственность, препятствующую полному раскрытию информации о методе, и/либо имеющий ограниченное владельцем интеллектуальной собственности использование или распространение (метода или) материалов для его реализации таким образом, что никакие альтернативные источники не будут доступны. Положение не затрагивает метод, на который распространяется только авторское право.

Требования

МОВВ требует от авторов метода предоставления соответствующих данных, чтобы Подкомиссия по методам анализа либо другая экспертная группа могли провести оценку. По итогам оценки Подкомиссия по методам анализа либо другая экспертная группа может представить методы анализа, являющиеся собственностью или основанные на частно-собственных аспектах, на утверждение Генеральной ассамблеи МОВВ в соответствии со следующими процедурами.

a) Запатентованный метод не следует одобрять, если доступен подходящий непатентованный метод анализа, который был одобрен или может быть одобрен и имеет аналогичные или лучшие рабочие характеристики. Это должно гарантировать отсутствие предпосылок, свидетельствующих, что МОВВ поддерживает какой-либо запатентованный метод в ущерб другим потенциальным методам; там, где это возможно, следует отдавать предпочтение принятию соответствующих критериев метода, а не одобрению конкретного запатентованного метода анализа.

b) При соблюдении необходимости разумной защиты интеллектуальной собственности должно быть доступно достаточно информации для обеспечения надежного использования метода аналитиками и для оценки эффективности метода Подкомиссией по методам анализа или другой экспертной группой. В отдельных случаях может потребоваться

расширенная информация, например детали принципа работы, по усмотрению Подкомиссии по методам анализа либо другой экспертной группы.

c) Предпочтение следует отдавать одобрению тех методов анализа, в которых реагенты и/или аппаратура описаны в той мере, в какой лаборатории или другие производители могут производить их сами; в качестве альтернативы может быть достаточно сведений, позволяющих им приобретать их самостоятельно.

d) Критерии эффективности метода, требуемые для запатентованных методов, такие же, как и для непатентованных методов. Критерии эффективности должны соответствовать сведениям, указанным выше. При необходимости должна быть предоставлена информация о влиянии изменчивости используемых реагентов.

e) После одобрения любые изменения, которые могут повлиять на рабочие характеристики, должны быть доведены до сведения Подкомиссии по методам анализа либо другой экспертной группы в целях дальнейшего рассмотрения.

f) Метод, некоторые элементы которого составляют защищенную конфиденциальную информацию, должен пройти полную совместную валидацию в соответствии со стандартами МОВВ, приведенными в Приложении А к Сборнику международных методов анализа вин и сусел. Результаты таких исследований будут доступны для Подкомиссии по методам анализа либо другой экспертной группы.

g) Производитель или сторона, подающая заявку на оценку патентованного метода, должна удовлетворительно продемонстрировать Подкомиссии по методам анализа или другой экспертной группе, что основные принципы и характеристики реализации метода могут быть доступны для всех заинтересованных сторон.

h) Подкомиссия по методам анализа либо другая экспертная группа может отказать в оценке запатентованного метода, если ограничения интеллектуальной собственности необоснованно лимитируют исследования по определению свойств, области применения и достоверности метода или разработке улучшений технологии.

i) Если подходящие непатентованные методы становятся доступными и одобренными, статус ранее одобренного патентованного метода должен

быть пересмотрен и, при необходимости, изменен.

Метод OIV-MA-AS2-01 **Методы I и IV типа**

Плотность и удельный вес при 20ºC
(Резолюция OIV-OENO 601A-2021)

1. Область применения

Данная резолюция применима для определения плотности и удельного веса вин и сусла при 20 °C с использованием любого из следующих способов:

A. Пикнометрия Метод I типа,
B. Электронная денсиметрия с использованием генератора частоты Метод I типа,
C. Денсиметрия с использованием гидростатических весов Метод I типа,
D. Гидрометрия Метод IV типа.

2. Определение метода

Плотность – это отношение массы определенного объема вина или сусла при температуре 20°C к этому объему. Она выражается в г/см^3 и обозначается как ρ20 °C.

Удельный вес – это отношение плотности вещества к плотности эталонного материала. Для анализа вина или сусла его обычно выражают как отношение плотности вина или сусла при 20 °C к плотности воды при 20 °C. Его символ: $d^{20°C}_{20°C}$

Примечание: Удельный вес можно получить из плотности ρ 20 при 20 °C: ρ 20= 0.998203 x $d^{20°C}_{20°C}$ или $d^{20°C}_{20°C}$ = ρ 20/0.998203 (где 0.998203 это плотность воды при 20 °C в г/см^3)

3. Сущность метода

Принцип каждого метода подробно описан в следующих частях:

Метод A: пикнометрия

Метод B: Электронная денсиметрия с использованием генератора частоты

Метод C: Денсиметрия с использованием гидростатических весов

Метод D: гидрометрия

*Примечание:*Для очень точных определений плотность должна быть скорректирована с учетом действия диоксида серы.

ρ 20 (г/см^3) = *'20 - 0.0006* ^{x} S
ρ 20 (г/см^3) = скорректированная плотность
ρ ‘20 (г/см^3) = наблюдаемая плотность

S $_{(г/Л)}$ = общий диоксид серы

4. Предварительная подготовка проб

Если вино или сусло содержат заметное количество углекислого газа, удаляют большую его часть, например, взболтав 250 мл пробы в 1000-мл флаконе или путем фильтрации при пониженном давлении через 2 г ваты, помещенной в удлинительную трубку или любым другим подходящим способом.

Метод A: плотность при 20 °C и удельный вес при 20 °C, измеренные пикнометрически (типовой метод)

A.1 Сущность метода

Плотность вина или сусла измеряется при определенной температуре с помощью стеклянного пикнометра. Он состоит из колбы известной вместимости, на которую надевается полая притертая пробка, снабженная капиллярной трубкой. При закрытии колбы закрыта, излишек жидкости поднимается в капиллярной трубке. При известных объеме колбы и капилляра, плотность определяют взвешиванием на прецизионных весах до и после заполнения пикнометра.

A.2 Реактивы и материалы

A.2.1 Вода типа II для аналитического использования (стандарт ISO 3696) или эквивалентной чистоты

A.2.2 Раствор хлорида натрия (2% масс./об.)
Чтобы приготовить 1 литр, взвешивают 20 г хлорида натрия и растворяют в нужном объеме воды.

A.3 Используемые аппаратура и материалы

Текущее лабораторное оборудование, включая следующее:

A.3.1 Пикнометр из пирексного стекла емкостью около 100 мл со съемным термометром, со шлифованным стеклянным швом, градуированным с точностью до десятых долей градуса от 10 °C до 30 °C. Этот термометр должен быть откалиброван (рис. 1).

Можно использовать любой пикнометр с эквивалентными характеристиками.

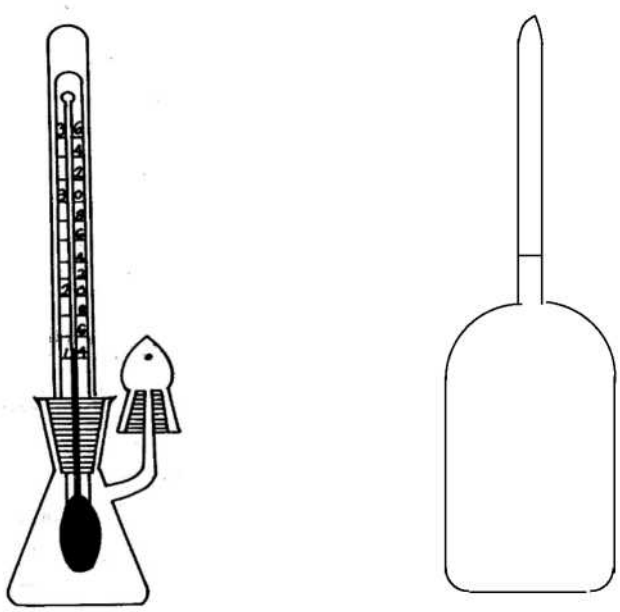


РИСУНОК 1: Пикнометр и его тарная бутыль

Данный пикнометр имеет боковую трубку длиной 25 мм с внутренним диаметром не более 1 мм, оканчивающуюся притертой шлифованной конической частью. Эта боковая трубка может быть закрыта «пробкой резервуара», состоящей из шлифованной конической трубки, оканчивающейся коническим соединением. Эта заглушка служит расширительной камерой. Два шлифовых соединения аппарата должны быть произведены с большой тщательностью.

A.3.2 Тарная бутыль того же внешнего объема (с точностью до 1 мл), что и пикнометр, и массой, равной массе пикнометра, наполненной жидкостью плотностью 1,01 г/мл (раствор натрия хлорида 2% м/об).

A.3.3 Термоизолированная оболочка, точно облегающая корпус пикнометра.

A.3.4 Весы с двумя тарелками с точностью до 0,1 мг или однотарелочные весы с точностью до 0,1 мг.

A.3.5 Гири, калиброванные аккредитованным органом

A.4 Проведение исследования

A.4.1 Калибровка пикнометра

Калибровка пикнометра включает определение следующих характеристик:

- вес тары,
- объем при 20 °C,
- масса воды при 20 °C.

A.4.1.1 *Использование весов с двумя чашами*

Помещают тарную бутыль на левую чашу, а чистый сухой пикнометр с пробкой на правую чашу. Уравновешивают их, поместив гири известной массы со стороны пикнометра: *p* грамм.

- Аккуратно наполняют пикнометр водой (A.2.1) комнатной температуры и устанавливают термометр.

Тщательно вытирают пикнометр насухо и помещают его в теплоизолирующий кожух. Встряхивают, переворачивая контейнер, пока показания термометра не станут постоянными, точно регулируют уровень до верхнего края боковой трубки, протирают боковую трубку начисто и устанавливают пробку резервуара.

Внимательно прочитывают значение температуры *t* °C и при необходимости исправляют любые неточности на шкале температур.

Взвешивают заполненный водой пикнометр с весом в граммах *p′*, установив равновесие.

Расчеты :

- Тара пустого пикнометра:

Вес тары = $p + m$ где m (g) = масса воздуха, содержащегося в пикнометре
m (g) = 0.0012 $(p - p')$

- Объем при 20 °C в мл:

V 20 °C (мл) = $(p + m - p')$ x F_t

F_t = коэффициент для температуры, t °C, взятый из таблицы I

V 20 °C должна быть известна с точностью ± 0.001 мл

- Масса воды при 20 °C:

M20 °C (г) = V20 °C x 0.998203
0.998203 (г/см^3) = плотность воды при 20 °C

A.4.1.2 *Использование весов с одной тарелкой*

Позволяет определить:

- массу чистого сухого пикнометра: P,
- массу заполненного водой пикнометра при *t* °C: P1, следуя инструкциям, изложенным в A.4.1.1,
- массу тарной бутылки, T0.
- Расчеты:

Тара пустого пикнометра:
вес тары: P – *m* где *m* (g) = масса воздуха, содержащегося в пикнометре
m (g) = 0.0012 (P1 - P)

- Объем при 20 °C в мл:
  V 20 °C (мл) = [P1 - (P - *m*)] x F_t

F_t = коэффициент для температуры, t °C, взятый из табл. I, *t* °C
V 20 °C должно быть известно с точностью ± 0.001 мл

- Масса воды при 20 °C:
  M20 °C (г) = V20 °C x 0.998203
  0.998203 = плотность воды при 20 °C (г/см^3)

A.4.2 Определение плотности:

A.4.2.1 *Использование весов с двумя чашами*

Взвешивают пикнометр, заполненный испытуемым образцом, следуя инструкциям, изложенным в A.4.1.1.
Где *p*" представляет собой массу в граммах, которая достигает равновесия при *t* °C, с учетом того, что масса жидкости, содержащаяся в пикнометре = *p* + *m* - *p*", кажущаяся плотность при *t* °C, в г/см определяется следующей формулой:

$$\rho_{t°C} = \frac{p + m - p''}{V_{20°C}}$$

Вычисляют плотность при 20 °C, используя одну из следующих таблиц поправок в Приложении I, в зависимости от характера анализируемой жидкости и типа используемого пикнометра: сухое вино и безалкогольное вино (таблица II или V), натуральное или концентрированное сусло (таблица

III или VI) или ликерное вино (таблица IV или VII).

A.4.2.2. *Использование весов с одной чашей*

Взвешивают тарную бутыль, где T1 ее масса в г.
Вычисляют *d*T = T1 - To
Масса пустого пикнометра на момент измерения = P - *m* + *d*T в г.
Взвешивают пикнометр, заполненный испытуемым образцом, следуя инструкциям, изложенным в A.4.1.1.
Где P2 представляет его массу при *t* °C.
Масса жидкости, содержащаяся в пикнометре при *t* °C = P2 (P - *m* + *d*T) в г.
и Кажущаяся плотность при *t* °C, в г/см^3 рассчитывается согласно формуле:

$$Pt°c = \frac{P_2 - (P - m + dT)}{V\ 20°C}$$

Вычисляют плотность при 20 °C анализируемой жидкости: сухое вино, натуральное или концентрированное сусло или ликерное вино, как указано в A.4.2.1.

A.5 Выражение результатов

Плотность выражается в г/см^3 с точностью до 5 знаков после запятой.

A.6 Прецизионность

A.6.1 Повторяемость по плотности:
- для сухих и сладких вин, кроме ликерных: r = 0.00010 г/см^3,
- для ликерных вин: r = 0.00018 г/см^3.

A.6.2. Воспроизводимость по плотности:
- для сухих и сладких вин, кроме ликерных: R = 0.00037 г/см^3,
- для ликерных вин: R = 0.00045 г/см^3.

A.7 Числовой пример

A.7.1 Измерение пикнометром на двухтарелочных весах
A/ Калибровка пикнометра
1. Взвешивание чистого сухого пикнометра:

Тара = пикнометр + *p*
p = 104.9454 г

2. Взвешивание заполненного водой пикнометра при температуре *t* °C:
   Тара = пикнометр + вода + *p′*
   p′ = 1.2396 г для *t* = 20.5 °C
3. Расчет массы воздуха, содержащегося в пикнометре:
   m = 0.0012 *(p -p')*
   m = 0.0012 (104.9454 - 1.2396)
   m = 0.1244
4. Параметры, которые необходимо сохранить:
   Тара пустого пикнометра: *p* + *m*
   p + *m* = 104.9454 + 0.1244
   p + *m* = 105.0698 г

Объем при 20 °C = (*p* + *m* - *p′*) x F_t °C
F20.50 °C = 1.001900
V20 °C = (105.0698 - 1.2396) x 1.001900
V20 °C = 104.0275 мл

Масса воды при 20 °C = V20 °C x 0.998203
M20 °C = 103.8405 г

B/ Определение плотности при 20 °C и удельного веса 20 °C/20 °C сухого вина:
p′ = 1.2622 g при 17.80 °C

p″ = 1,2622 g à 17,80 °C

$$\rho_{17,80\ °C} = \frac{105,0698 - 1,2622}{104,0275}$$

ρ 17.80 °C = 0.99788 г/см³

Таблица II позволяет рассчитать ρ20 °C из ρt °C по следующей формуле:

$$\rho_{20\ °C} = \rho_{t\ °C} \pm \frac{c}{1000}$$

Для *t* = 17.80 °c и крепости спирта 11% об., *c* = 0.54:

$$\rho_{20\ °C} = 0,99788 - \frac{0,54}{1000}$$

$$\rho\,20\,^{\circ}C = 0.99788\ г/см^3$$

$$d_{20\,^{\circ}C}^{20\,^{\circ}C} = \frac{0.99734}{0.99820} = 0.99913$$

A.7.2 Измерение пикнометром на однотарелочных весах

A/ Установление констант пикнометра

1. Взвешивание чистого сухого пикнометра:
   P = 67.7913 г
2. Взвешивание заполненного водой пикнометра при *t* °C:
   P1 = 169.2715 г при 21.65 °C
3. Расчет массы воздуха, содержащегося в пикнометре:
   m = 0.0012 (P1 - P)
   m = 0.0012 x 101.4802
   m = 0.1218 г
4. Характеристики, которые необходимо сохранить:
   Тара пустого пикнометра: P - *m*
   P - *m* = 67.7913 - 0.1218
   P - *m* = 67.6695 г
   Объем при 20 °C = [P1 - (P - *m*)] x Ft °C
   F21.65 °C = 1.002140
   V20 °C = (169.2715 - 67.6695) x 1.002140
   V20 °C = 101.8194 мл
   Масса воды при 20 °C: V20 °C x 0.998203
   M20 °C = 101.6364 г
   Масса тарной бутылки: T0
   T0 = 171.9160 г

B/ Определение плотности при 20 °C и 20 °C/20 °C удельного веса сухого вина:

$$T_1 = 171.9178$$
$$dT = 171.9178 - 171.9160 = 0.0018\ g$$
$$P - m + dT = 67.6695 + 0.0018 = 67.6713\ g$$
$$P_2 = 169.2799 \text{ at } 18\,^{\circ}C$$
$$\rho_{18\,^{\circ}C} = \frac{169.2799 - 67.6713}{101.8194}$$
$$\rho_{18\,^{\circ}C} = 0.99793\ g/cm^3$$

Таблица II позволяет рассчитать ρ20 °C из ρt °C по следующей формуле:

$$\rho_{20\,°C} = \rho_{t\,°C} \pm \frac{c}{1000}$$

Для t = 18 °C и для крепости спирта11% об., *c* = 0.49:

$$\rho_{20\,°C} = 0.99793 - \frac{0.49}{1000}$$

$$\rho_{20\,°C} = 0.99744\ \mathrm{g/cm^3}$$

$$d_{20\,°C}^{20\,°C} = \frac{0.99744}{0.998203} = 0.99923$$

Метод B: Плотность при 20 °C и удельный вес при 20 °C, измеренные с помощью электронной денсиметрии с использованием генератора частоты (метод типа I).

B.1 Сущность метода

Плотность вина или сусла измеряется электронной денсиметрией с использованием генератора частоты. Принцип состоит в измерении периода колебаний трубки, содержащей образец, подвергающийся электромагнитной стимуляции. Плотность связана с периодом колебаний следующей формулой:

$$\rho = T^2 \times \left(\frac{C}{4\pi^2 V}\right) - \left(\frac{M}{V}\right) \qquad (1)$$

ρ = плотность пробы
T = период вынужденных колебаний
M = масса пустой трубы
C = постоянность пружины
V = объем вибрирующей пробы

Это соотношение имеет форму $\rho = A\ T^2 - B$ (2), поэтому существует линейная зависимость между плотностью и квадратом периода. Константы A and B специфичны для каждого осциллятора и оцениваются путем измерения периода жидкости с известной плотностью.

B.2. Реактивы и продукты

B.2.1 Эталонные жидкости

Для настройки денсиметра используются две эталонные жидкости. Плотности эталонных жидкостей должны охватывать плотности анализируемых вин или

сусел. Рекомендуется разброс более 0.01000 г/см^3 между плотностями эталонных жидкостей.

Эталонные жидкости, используемые для измерения плотности вин или сусел с помощью электронной денсиметрии, следующие:

- сухой воздух (незагрязненный),
- вода типа II для аналитического использования (стандарт ISO 3696) или эквивалент аналитической чистоты,
- водно-спиртовые растворы, вина или сусла, плотность которых была определена другим методом типа I, для которого погрешность не превышает 0.00005 г/см^3 при температуре 20.00 ± 0.05 °C,
- растворы, откалиброванные с прослеживаемостью по Международной системе единиц, с вязкостью менее 2 мм^2/с, для которых погрешность не превышает 0.00005 г/см^3 при температуре of 20.00 ± 0.05 °C.

B. 2.2 *Средства для чистки и сушки*

Используют продукты, обеспечивающие идеально чистое и сухое состояние измерительной ячейки в соответствии с остатками и указаниями производителя. Например:

- моющие средства, кислоты и т.д.,
- органические растворители: 96% об. этанол, чистый ацетон и др.

B.3 Используемые аппаратура и оборудование

B.3.1 Электронный плотномер с генератором частоты

Электронный плотномер состоит из следующих элементов:

- измерительная ячейка, состоящая из измерительной трубки и регулятора температуры,
- система настройки колебательной трубки и измерения периода колебаний,
- цифровой дисплей и, возможно, калькулятор,
- шприц для ввода пробы, автопробоотборник или другая эквивалентная система.

Плотномер размещается на абсолютно устойчивой опоре, изолированной от всех вибраций.

B.3.2 Температурный контроль измерительной ячейки

Помещают измерительную трубку в устройство с регулируемой температурой. Температурная стабильность должна быть с погрешностью не более ± 0.02 °C.

Необходимо контролировать температуру измерительной ячейки, когда это позволяет денсиметр, так как это сильно влияет на результаты измерений. Плотность водно-спиртового раствора с объёмным содержанием спирта (ABV) 10% об. составляет 0.98471 г/см^3 при 20°C и 0.98447 г/см^3 при 21°C, что соответствует разбросу 0.00024 г/см^3.

Температура испытания 20°C. Измеряют температуру ячейки с помощью термометра с погрешностью измерения до 0.01 °C в соответствии с национальными стандартами. Это должно обеспечивать возможность измерения температуры с погрешностью не более ± 0.07 °C.

B.3. Калибровка аппаратуры

Прибор следует калибровать перед первым использованием, а затем периодически или при неудовлетворительной проверке. Цель состоит в том, чтобы использовать две эталонные жидкости для расчета констант A и B [см. формулу (2), B.1]. Чтобы провести калибровку на практике, обращаются к руководству по эксплуатации аппаратуры. В принципе, эту калибровку проводят с сухим воздухом (с учетом атмосферного давления) и очень чистой водой (B.2.1).

B.3.4 Проверка калибровки

Для проверки калибровки измеряется плотность эталонных жидкостей.

- При постоянном использовании проводится ежедневная проверка плотности воздуха. Разница между теоретической плотностью и наблюдаемой плотностью более 0,00008 г/см3 может указывать на засорение трубки. В таком случае ее следует очистить. После очистки снова проверяют плотность воздуха. Если проверка не является убедительной, регулируют аппаратуру.
- Проверяют плотность воды; если разница между теоретической плотностью и наблюдаемой плотностью больше 0.00008 г/см^3, регулируют прибор.
- Если проверка температуры ячейки затруднена, можно напрямую проверить плотность водно-спиртового раствора, плотность которого сопоставима с плотностью анализируемых образцов.

B.3.5 Контроль

При разнице между теоретической плотностью эталонного раствора (известной с погрешностью ± 0.00005 г/см^3) и измеренной плотностью выше 0.00008 г/см^3, следует проверить калибровку прибора.

B.4 Проведение исследования

Перед измерением, при необходимости, очищают и высушивают ячейку ацетоном или абсолютным спиртом и сухим воздухом. Промывают ячейку с образцом.

Вводят образец в ячейку (используя шприц, автодозатор или другую аналогичную систему) так, чтобы она была полностью заполнена. При заполнении проверят, чтобы все пузырьки воздуха были удалены. Проба должна

быть однородной и не содержать твердых частиц. При необходимости проводят фильтрацию для удаления любых взвешенных веществ перед анализом.
Если имеется система освещения, позволяющая проверить отсутствие пузырей, быстро выключают ее после проверки, так как тепло, выделяемое лампой, может влиять на измеряемую температуру (для приборов с системой постоянного освещения это утверждение неприменимо).
Оператор должен убедиться, что температура измерительной ячейки стабильна. Как только показания стабилизируются, записывают плотность, ρ20°c.
Если прибор обеспечивает только период, плотность можно рассчитать по константам A и B (см. инструкции к оборудованию или Приложение I к методу OIV-MA-AS312-01A).

B.5 Выражение результатов

Плотность выражается в г/см^3 с точностью до 5 знаков после запятой.

B.6 Параметры прецизионности

Параметры прецизионности подробно описаны в таблице 4 Приложения II.
Повторяемость: r = 0.00011 г/см^3
Воспроизводимость: R = 0.00025 г/см^3

Метод C: Плотность при 20 °C и удельный вес при 20 °C, измеренные с помощью гидростатических весов (метод типа I).

C.1 Сущность метода

Плотность вина или сусел можно измерить с помощью денсиметрии с гидростатическим балансом в соответствии с принципом Архимеда, согласно которому любое тело, погруженное в жидкость, испытывает направленную вверх силу, равную весу вытесненной жидкости.

C.2 Реагенты и продукты

C.2.1 Вода типа II для аналитического использования (стандарт ISO 3696) или эквивалентной чистоты.

C.2.2 Раствор для промывки поплавков (гидроксид натрия, 30 % масс/об)

Для приготовления 100 мл раствора взвешивают 30 г гидроксида натрия и наливают 96% об. этилового спирта.

C.3 Используемые аппаратура и материалы

Обычное лабораторное оборудование, особенно:

C.3.1 Одночашечные гидростатические весы с точностью до 1 мг

C.3.2 Поплавок объемом не менее 20 мл, специально адаптированный для балансировки, подвешенный на нити диаметром не более 0,1 мм.

C.3.3 Цилиндрическая пробирка с индикатором уровня. Поплавок должен полностью помещаться в объеме пробирки ниже указателя уровня; только висящая нить должна пересекать поверхность жидкости. Цилиндрическая пробирка должна иметь внутренний диаметр не менее чем на 6 мм больше диаметра поплавка.

C.3.4 Термометр (или зонд для измерения температуры) с делением в градусах и десятых долях градуса, от 10 °C до 40 °C, откалиброван до ± 0.06 °C

C.3.5 Массы откалиброваны аккредитованным органом.

C.4 Проведение исследования

После каждого измерения поплавок и пробирку промывают дистиллированной водой, протирают мягкой лабораторной бумагой, не теряющей своих волокон, и ополаскивают раствором, плотность которого необходимо определить. Эти измерения следует проводить, как только прибор достигнет стабильного уровня, чтобы ограничить потерю спирта в результате испарения.

C.4.1 Калибровка аппаратуры

C.4.1.1 *Калибровка баланса*

В то время как весы обычно имеют внутреннюю систему калибровки, гидростатические весы следует калибровать с помощью гирь с прослеживаемостью по Международной системе единиц.

C.4.1.2 *Калибровка поплавка*

Заполняют цилиндрическую пробирку до указателя уровня водой (C.2.1), температура которой находится в пределах от 15°C до 25°C, но предпочтительно при 20°C.

Погружают поплавок и термометр в жидкость, встряхивают, записывают на приборе плотность и при необходимости корректируют показания так, чтобы они совпадали с плотностью воды при температуре измерения.

C.4.1.3 *Проверка с использованием раствора известной плотности*

Заполняют цилиндрическую пробирку до указателя уровня раствором известной плотности при температуре от 15 °C до 25 °C, предпочтительно при 20 °C.

Погружают поплавок и термометр в жидкость, перемешивают, измеряют плотность жидкости, показанную прибором, и записывают плотность и температуру, где плотность измеряется при *t °C* (ρt).

При необходимости корректируют *ρ*, используя таблицу плотностей ρt водно-спиртовых смесей (таблица II в приложении I).

Определенная таким образом плотность должна быть идентична ранее определенной плотности.

Примечание: Данный раствор известной плотности также может заменить воду для калибровки поплавка.

C.4.2 Определение плотности

Наливают испытуемый образец в цилиндрическую пробирку до указателя уровня.

Опускают поплавок и термометр в жидкость, встряхивают и записывают плотность на приборе. Отмечают температуру, если плотность измеряется при *t* °C (ρt).

Корректирут ρt, используя таблицу плотности ρt водно-спиртовых смесей (таблица II в приложении).

C.4.3 Очистка поплавка и цилиндрической пробирки

Погружают поплавок в промывочный раствор в пробирке на один час, регулярно переворачивая поплавок.

Промывают водопроводной водой, затем дистиллированной водой.

Протирают мягкой лабораторной бумагой, не теряющей свои волокна.

Выполняют эти операции при первом использовании поплавка, а затем при необходимости регулярно.

C.5 Выражение результатов

Плотность выражается в г/см^3 с точностью до 5 знаков после запятой**.**

C.6 Параметры прецизионности

Параметры прецизионности подробно описаны в таблице 4 Приложения II.

$r = 0.00025$ г/см^3

$R = 0.00067$ г/см^3

Метод D: Плотность, измеренная гидрометрическим методом
(метод типа IV)

D.1*Сущность метода*

Плотность и удельный вес при 20 °C определяют для испытуемого образца гидрометрическим методом по принципу Архимеда. Взвешенный цилиндр, снабженный градуированным стержнем, более или менее погружается в жидкий образец, плотность которого необходимо определить. Плотность жидкости считывается непосредственно по градуировке стержня на уровне мениска.

D.2 Используемая аппаратура

D.2.1 Ареометр

Ареометры должны соответствовать требованиям ISO в отношении их размеров и градуировки.

Они должны иметь цилиндрический корпус и круглый стержень с поперечным сечением не менее 3 мм в диаметре. Для сухих вин они должны быть градуированы в г/см^3 от 0.983 до 1.003, с делениями через каждые 0.001 и 0.0002 интервала. Все метки с интервалом 0.001 должны быть отделены друг от друга не менее чем на 5 мм. Для измерения удельного веса безалкогольных вин, ликерных вин и сусла следует использовать набор из 5 ареометров, градуированных (в г/см^3) от 1.000-1.030; 1.030-1.060; 1.060-1.090; 1.090-1.120; 1.120-1.150. Эти ареометры должны быть проградуированы по плотности при 20 °C с помощью отметок и интервалов не более 0.001 и 0.0005, причем все отметки с интервалами 0.001 отстоят от следующих не менее чем на 3 мм. Эти ареометры должны быть отградуированы таким образом, чтобы их показания можно было считывать на «в верхней части мениска». Индикация градуировки плотности при 20°C или удельного веса при 20°C, а также показания в верхней части мениска должны быть даны либо на градуированной шкале, либо на полоске бумаги, прикрепленной к колбе.

Этот прибор должен быть откалиброван в соответствии с Международной системой единиц.

D.2.2 Термометр, градуированный с интервалом не более 0.5°C, откалиброванный с прослеживаемостью по Международной системе единиц.

D.2.3 Мерный цилиндр с размерами, позволяющими погружать термометр и ареометр без соприкосновения со стенками, удерживается вертикально.

D.3 *Метод измерения*

Помещат 250 мл испытуемого образца (4) в мерный цилиндр (D.2.3) и вставляют ареометр и термометр. Перемешивают образец и ожидают 1 минуту, чтобы температура уравновесилась, затем снимают показания термометра. Вынимают термометр и после 1 минуты покоя измерят кажущуюся плотность при *t*°C на стержне ареометра.

Корректирут кажущуюся плотность, измеренную при *t*°C, на влияние температуры, используя

таблицы в Приложении I, применимые к сухим винам (таблица V), натуральному и концентрированному суслу (таблица VI) и ликерным винам (таблица VII).

D.4 Выражение результатов

Плотность выражается в г/см^3 с точностью до 4 знаков после запятой.

5. Приложения

ПРИЛОЖЕНИЕ I Таблицы

ТАБЛИЦА I

Коэффициенты F, на которые необходимо умножить массу воды в пикнометре из пирексового стекла при *t* °C, чтобы рассчитать объем пикнометра при 20 °C

t oC	F	*t* oC	F	*t* oC	F	*t* oC	F	*t* oC	F	*t* oC	F	*t* oC	F
10.0	1.000398	13.0	1.000691	16.0	1.001097	19.0	1.001608	22.0	1.002215	25.0	1.002916	28.0	1.003704
.1	1.000406	.1	1.000703	.1	1.001113	.1	1.001627	.1	1.002238	.1	1.002941	.1	1.003731
.2	1.000414	.2	1.000714	.2	1.001128	.2	1.001646	.2	1.002260	.2	1.002966	.2	1.003759
.3	1.000422	.3	1.000726	.3	1.001144	.3	1.001665	.3	1.002282	.3	1.002990	.3	1.003797
.4	1.000430	.4	1.000738	.4	1.001159	.4	1.001684	.4	1.002304	.4	1.003015	.4	1.003815
10.5	1.000439	13.5	1.000752	16.5	1.001175	19.5	1.001703	22.5	1.002326	25.5	1.003041	28.5	1.003843
.6	1.000447	.6	1.000764	.6	1.001191	.6	1.001722	.6	1.002349	.6	1.003066	.6	1.003871
.7	1.000456	.7	1.000777	.7	1.001207	.7	1.001741	.7	1.002372	3	1.003092	.7	1.003899
.8	1.000465	.8	1.000789	.8	1.001223	.8	1.001761	.8	1.002394	.8	1.003117	.8	1.003928
.9	1.000474	.9	1.000803	.9	1.001239	9	1.001780	.9	1.002417	.9	1.003143	.9	1.003956
11.0	1.000483	14.0	1.000816	17.0	1.001257	20.0	1.001800	23.0	1.002439	26.0	1.003168	29.0	1.003984
.1	1.000492	.1	1.000829	.1	1.001273	.1	1.001819	.1	1.002462	.1	1.003194	.1	1.004013
.2	1.000501	.2	1.000842	.2	1.001286	.2	1.001839	.2	1.002485	1	1.003222	2	1.004042
3	1.000511	3	1.000855	3	1.001306	.3	1.001959	.3	1.002508	.3	1.003247	.3	1.004071
.4	1.000520	.4	1.000868	.4	1.001323	.4	1.001880	.4	1.002531	.4	1.003273	.4	1.004099
11.5	1.000530	14.5	1.000882	17.5	1.001340	20.5	1.001900	23.5	1.002555	26.5	1.003299	29.5	1.004128
.6	1.000540	.6	1.000895	.6	1.001357	.6	1.001920	.6	1.002578	.6	1.003326	.6	1.004158
.7	1.000550	.7	1.000909	.7	1.001374	.7	1.001941	3	1.002602	.7	1.003352	.7	1.004187
.8	1.000560	.8	1.000923	.8	1.001391	.8	1.001961	.8	1.002625	.8	1.003379	.8	1.004216
.9	1.000570	.9	1.000937	.9	1.001409	.9	1.001982	.9	1.002649	.9	1.003405	.9	1.004245
12.0	1.000580	15.0	1.000951	18.0	1.001427	21.0	1.002002	24.0	1.002672	27.0	1.003432	30.0	1.004275
.1	1.000591	.1	1.000965	.1	1.001445	.1	1.002023	.1	1.002696	.1	1.003459		
.2	1.000601	.2	1.000979	.2	1.001462	.2	1.002044	.2	1.002720	.2	1.003485		
.3	1.000612	.3	1.000993	.3	1.001480	.3	1.002065	.3	1.002745	.3	1.003513		
.4	1.000623	.4	1.001008	.4	1.001498	.4	1.002086	.4	1.002769	.4	1.003540		
12.5	1.000634	15.5	1.001022	18.5	1.001516	21.5	1.002107	24.5	1.002793	27.5	1.003567		
.6	1.000645	.6	1.001037	.6	1.001534	.6	1.002129	.6	1.002817	.6	1.003594		
.7	1.000656	.7	1.001052	.7	1.001552	.7	1.002151	.7	1.002842	.7	1.003621		
.8	1.000668	.8	1.001067	.8	1.001570	.8	1.002172	.8	1.002866	.8	1.003649		
.9	1.000679	.9	1.001082	.9	1.001589	.9	1.002194	.9	1.002891	.9	1.003676		

ТАБЛИЦА II

Температурные поправки, *c*, необходимые для плотности сухих и безалкогольных вин, измеряемой с использованием пикнометра из пирексового стекла при *t* °C. Чтобы внести поправку на 20 °C.

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

– если *t* °C ниже, чем 20 °C
+ если *t* °C выше, чем 20 °C

Температура° C	Алкогольная крепость																								
	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
10	1.59	1.64	1.67	1.71	1.77	1.84	1.91	2.01	2.11	2.22	2.34	2.46	2.60	2.73	2.88	3.03	3.19	3.35	3.52	3.70	3.87	4.06	4.25	4.44
11	1.48	1.53	1.56	1.60	1.64	1.70	1.77	1.86	1.95	2.05	2.16	2.27	2.38	2.51	2.63	2.77	2.91	3.06	3.21	3.36	3.53	3.69	3.86	4.03
12	1.36	1.40	1.43	1.46	1.50	1.56	1.62	1.69	1.78	1.86	1.96	2.05	2.16	2.27	2.38	2.50	2.62	2.75	2.88	3.02	3.16	3.31	3.46	3.61
13	1.22	1.26	1.28	1.32	1.35	1.40	1.45	1.52	1.59	1.67	1.75	1.83	1.92	2.01	2.11	2.22	2.32	2.44	2.55	2.67	2.79	2.92	3.05	3.18
14	1.08	1.11	1.13	1.16	1.19	1.23	1.27	1.33	1.39	1.46	1.52	1.60	1.67	1.75	1.94	1.93	2.03	2.11	2.21	2.31	2.42	2.52	2.63	2.74.
15	0.92	0.96	0.97	0.99	1.02	1.05	1.09	1.13	1.19	1.24	1.30	1.36	1.42	1.48	1.55	1.63	1.70	1.78	1.86	1.95	2.03	2.12	2.21	2.30
16	0.76	0.79	0.80	0.81	0.94	0.86	0.89	0.93	0.97	1.01	1.06	1.10	1.16	1.21	1.26	1.32	1.38	1.44	1.51	1.57	1.64	1.71	1.78	1.85
17	0.59	0.61	0.62	0.63	0.65	0.67	0.69	0.72	0.75	0.78	0.81	0.85	0.88	0.95	0.96	1.01	1.05	1.11	1.15	1.20	1.25	1.30	1.35	1.40
18	0.40	0.42	0.42	0.43	0.44	0.46	0.47	0.49	0.51	0.53	0.55	0.57	0.60	0.63	0.65	0.68	0.71	0.74	0.77	0.81	0.84	0.87	0.91	0.94
19	0.21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28	0.29	0.30	0.32	0.33	0.34	0.36	0.37	0.39	0.41	0.42	0.44	0.46	0.47
20																								
21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28	0.29	0.30	0.31	0.32	0.34	0.36	0.37	0.38	0.40	0.41	0.43	0.44	0.46	0.48
22	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.51	0.52	0.54	0.56	0.59	0.61	0.63	0.66	0.69	0.71	0.74	0.77	0.80	0.83	0.87	0.90	0.93	0.97
23	0.68	0.70	0.71	0.72	0.74	0.76	0.78	0.80	0.83	0.86	0.90	0.93	0.96	1.00	1.03	1.08	1.13	1.17	1.22	1.26	1.31	1.37	1.41	1.46
24	0.93	0.96	0.97	0.99	1.01	1.03	1.06	1.10	1.13	1.18	1.22	1.26	1.31	1.36	1.41	1.47	1.52	1.58	1.64	1.71	1.77	1.84	1.90	1.97
25	1.19	1.23	1.25	1.27	1.29	1.32	1.36	1.40	1.45	1.50	1.55	1.61	1.67	1.73	1.80	1.86	1.93	2.00	2.08	2.16	2.24	2.32	2.40	2.48
26	1.47	1.51	1.53	1.56	1.59	1.62	1.67	1.72	1.77	1.83	1.90	1.96	2.03	2.11	2.19	2.27	2.35	2.44	2.53	2.62	2.72	2.81	2.91	3.01
27	1.75	1.80	1.82	1.85	1.89	1.93	1.98	2.04	2.11	2.18	2.25	2.33	2.41	2.50	2.59	2.68	2.78	2.88	2.98	3.09	3.20	3.31	3.42	3.33
28	2.04	2.10	2.13	2.16	2.20	2.25	2.31	2.38	2.45	2.53	2.62	2.70	2.80	2.89	3.00	3.10	3.21	3.32	3.45	3.57	3.69	3.82	3.94	4.07
29	2.34	2.41	2.44	2.48	2.53	2.58	2.65	2.72	2.81	2.89	2.99	3.09	3.19	3.30	3.42	3.53	3.65	3.78	3.92	4.05	4.19	4.33	4.47	4.61
30	2.66	2.73	2.77	2.81	2.86	2.92	3.00	3.08	3.17	3.27	3.37	3.48	3.59	3.72	3.84	3.97	4.11	4.25	4.40	4.55	4.70	4.85	4.92	5.17

Примечание: Эту таблицу можно использовать для преобразования плотности от d^{t}_{20} до d^{20}_{20}

ТАБЛИЦА III

Температурные поправки, *c*, необходимые для плотности натурального или концентрированных сусел, измеряемой с помощью пикнометра из пирексового стекла при *t* °C. Чтобы внести поправку на 20 °C

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

– если *t* °C ниже, чем 20 °C
+ если *t* °C выше, чем 20 ° C

Температура °C	Плотность																					
	1.05	1.06	1.07	1.08	1.09	1.10	1.11	1.12	1.13	1.14	1.15	1.16	1.18	1.20	1.22	1.24	1.26	1.28	1.30	1.32	1.34	1.36
10	2.31	2.48	2.66	2.82	2.99	3.13	3.30	3.44	3.59	3.73	3.88	4.01	4.28	4.52	4.76	4.98	5.18	5.42	5.56	5.73	5.90	6.05
11	2.12	2.28	2.42	2.57	2.72	2.86	2.99	3.12	3.25	3.37	3.50	3.62	3.85	4.08	4.29	4148	4.67	4.84	5.00	5.16	5.31	5.45
12	1.92	2.06	2.19	2.32	2.45	2.58	2.70	2.92	2.94	3.04	3.15	3.26	3.47	3.67	3.85	4.03	4.20	4.36	4.51	4.65	478	4.91
13	1.72	1.84	1.95	2.06	2.17	2.27	2.38	2.48	2.58	2.69	2.78	2.89	3.05	3.22	3.39	3.55	3.65	3.84	3.98	4.11	4.24	4.36
14	1.52	1.62	1.72	1.81	1.90	2.00	2.09	2.17	2.26	2.34	2.43	2.51	2.66	2.82	2.96	3.09	3.22	3.34	3.45	3.56	3.67	3.76
15	1.28	1.36	1.44	1.52	1.60	1.67	1.75	1.82	1.89	1.96	2.04	2.11	2.24	2.36	2.48	2.59	2.69	2.79	2.88	2.97	3.03	3.10
16	1.05	1.12	1.18	1.25	1.31	1.37	1.43	1.49	1.55	1.60	1.66	1.71	1.81	1.90	2.00	2.08	2.16	2.24	2.30	2.37	2.43	2.49
17	0.80	0.86	0.90	0.95	1.00	1.04	1.09	1.13	1.18	1.22	1.26	1.30	1.37	1.44	1.51	1.57	1.62	1.68	1.72	1.76	1.80	1.84
18	0.56	0.59	0.62	0.66	0.68	0.72	0.75	0.77	0.80	0.83	0.85	0.88	0.93	0.98	1.02	1.05	1.09	1.12	1.16	1.19	1.21	1.24
19	0.29	0.31	0.32	0.34	0.36	0.37	0.39	0.40	0.42	0.43	0.44	0.45	0.48	0.50	0.52	0.54	0.56	0.57	0.59	0.60	0.61	0.62
20																						
21	0.29	0.30	0.32	0.34	0.35	0.37	0.38	0.40	0.41	0.42	0.44	0.46	0.48	0.50	0.53	0.56	0.58	0.59	0.60	0.61	0.62	0.62
22	0.58	0.61	0.64	0.67	0.70	0.73	0.76	0.79	0.81	0.84	0.87	0.90	0.96	1.03	1.05	1.09	1.12	1.15	1.18	1.20	1.22	1.23
23	0.89	0.94	0.99	1.03	1.08	1.12	1.16	1.20	1.25	1.29	1.33	1.37	1.44	1.51	1.57	1.63	1.67	1.73	1.77	1.80	1.82	1.94
24	1.20	1.25	1.31	1.37	1.43	1.49	1.54	1.60	1.66	1.71	1.77	1.82	1.92	2.01	2.10	2.17	2.24	2.30	2.36	2.40	2.42	2.44
25	1.51	1.59	1.66	1.74	1.81	1.88	1.95	2.02	2.09	2.16	2.23	2.30	2.42	2.53	2.63	2.72	2.82	2.89	2.95	2.99	3.01	3.05
26	1.84	1.92	2.01	2.10	2.18	2.26	2.34	2.42	2.50	2.58	2.65	2.73	2.87	3.00	3.13	3.25	3.36	3.47	3.57	3.65	372	3.79
27	2.17	2.26	2.36	2.46	2.56	2.66	2.75	2.84	2.93	3.01	3.10	3.18	3.35	3.50	3.66	3.80	3.93	4.06	4.16	4.26	4.35	4.42
28	2.50	2.62	2.74	2.85	2.96	3.07	3.18	3.28	3.40	3.50	3.60	3.69	3.87	4.04	4.21	4.36	4.50	4.64	4.75	4.86	4.94	5.00
29	2.86	2.98	3.10	3.22	3.35	3.47	3.59	3.70	3.82	3.93	4.03	4.14	4.34	4.53	4.72	4.89	5.05	5.20	5.34	5.46	5.56	5.64
30	3.20	3.35	3.49	3.64	3.77	3.91	4.05	4.17	4.30	4.43	4.55	4.67	4.90	5.12	5.39	5.51	5.68	5.94	5.96	6.09	6.16	6.22

Примечание: Эту таблицу можно использовать для преобразования плотности от d^{t}_{20} до d^{20}_{20}

ТАБЛИЦА IV

Температурные поправки, *c*, необходимые для плотности ликерных вин, измеряемой с помощью пикнометра из пирексового стекла при *t* °C. Чтобы внести поправку на 20 °C

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

– если *t* °C ниже, чем 20 °C
+ если *t* °C выше, чем 20 °C

		13% об. вина							15% об. вина							17% об. вина						
		Плотность							Плотность							Плотность						
		1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120	1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120	1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120
Температура °C	10	2.36	2.71	3.06	3.42	3.72	3.96	4.32	2.64	2.99	3.36	3.68	3.99	4.30	4.59	2.94	3.29	3.64	3.98	4.29	4.60	4.89
	11	2.17	2.49	2.80	2.99	3.39	3.65	3.90	2.42	2.73	3.05	3.34	3.63	3.89	4.15	2.69	3.00	3.32	3.61	3.90	4.16	4.41
	12	1.97	2.25	2.53	2.79	3.05	3.29	3.52	2.19	2.47	2.75	3.01	3.27	3.51	3.73	2.42	2.70	2.98	3.24	3.50	3.74	3.96
	13	1.78	2.02	2.25	2.47	2.69	2.89	3.09	1.97	2.21	2.44	2.66	2.87	3.08	3.29	2.18	2.42	2.64	2.87	3.08	3.29	3.49
	14	1.57	1.78	1.98	2.16	2.35	2.53	2.70	1.74	1.94	2.14	2.32	2.52	2.69	2.86	1.91	2.11	2.31	2.50	2.69	2.86	3.03
	15	1.32	1.49	1.66	1.82	1.97	2.12	2.26	1.46	1.63	1.79	1.95	2.10	2.25	2.39	1.60	1.77	1.93	2.09	2.24	2.39	2.53
	16	1.08	1.22	1.36	1.48	1.61	1.73	1.84	1.18	1.32	1.46	1.59	1.71	1.83	1.94	1.30	1.44	1.58	1.71	1.83	1.95	2.06
	17	0.83	0.94	1.04	1.13	1.22	1.31	1.40	0.91	1.02	1.12	1.21	1.30	1.39	1.48	1.00	1.10	1.20	1.30	1.39	1.48	1.56
	18	0.58	0.64	0.71	0.78	0.84	0.89	0.95	0.63	0.69	0.76	0.83	0.89	0.94	1.00	0.69	0.75	0.82	0.89	0.95	1.00	1.06
	19	0.30	0.34	0.37	0.40	0.43	0.46	0.49	0.33	0.37	0.40	0.43	0.46	0.49	0.52	0.36	0.39	0.42	0.46	0.49	0.52	0.54
	20	0.30	0.33	0.36	0.40	0.43	0.46	0.49	0.33	0.36	0.39	0.43	0.46	0.49	0.51	0.35	0.39	0.42	0.45	0.48	0.51	0.54
	22	0.60	0.67	0.73	0.80	0.85	0.91	0.98	0.65	0.72	0.78	0.84	0.90	0.96	1.01	0.71	0.78	0.84	0.90	0.96	1.01	1.07
	23	0.93	1.02	1.12	1.22	1.30	1.39	1.49	1.01	1.10	1.20	1.29	1.38	1.46	1.55	1.10	1.19	1.29	1.38	1.46	1.55	1.63
	24	1.27	1.39	1.50	1.61	1.74	1.84	1.95	1.37	1.49	1.59	1.72	1.84	1.95	2.06	1.48	1.60	1.71	1.83	1.95	2.06	2.17
	25	1.61	1.75	1.90	2.05	2.19	2.33	2.47	1.73	1.87	2.02	2.17	2.31	2.45	2.59	1.87	2.01	2.16	2.31	2.45	2.59	2.73
	26	1.94	2.12	2.29	2.47	2.63	2.79	2.95	2.09	2.27	2.44	2.62	2.78	2.94	3.10	2.26	2.44	2.61	2.79	2.95	3.11	3.26
	27	2.30	2.51	2.70	2.90	3.09	3.27	3.44	2.48	2.68	2.87	3.07	3.27	3.45	3.62	2.67	2.88	3.07	3.27	3.46	3.64	3.81
	28	2.66	2.90	3.13	3.35	3.57	3.86	4.00	2.86	3.10	3.23	3.55	3.77	3.99	4.20	3.08	3.31	3.55	3.76	3.99	4.21	4.41
	29	3.05	3.31	3.56	3.79	4.04	4.27	4.49	3.28	3.53	3.77	4.02	4.26	4.49	4.71	3.52	3.77	4.01	4.26	4.50	4.73	4.95
	30	3.44	3.70	3.99	4.28	4.54	4.80	5.06	3.68	3.94	4.23	4.52	4.79	5.05	5.30	3.95	4.22	4.51	4.79	5.07	5.32	5.57

ТАБЛИЦА IV (продолжение)

Температурные поправки, c, необходимые для плотности ликерных вин, измеряемой с помощью пикнометра из пирексового стекла *t* °C. Чтобы внести поправку на 20 °C.

$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$

– если *t* °C ниже, чем 20 °C

+ если *t* °C выше, чем 20 °C

		19% об. вина							21% об. вина						
		Плотность							Плотность						
		1.000	1.020	1.040	1.060	1.000	1.100	1.120	1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120
Температура °C	10	3.27	3.62	3.97	4.30	4.62	4.92	5.21	3.62	3.97	4.32	4.66	4.97	5.27	5.56
	11	2.99	3.30	3.61	3.90	4.19	4.45	4.70	3.28	3.61	3.92	4.22	4.50	4.76	5.01
	12	2.68	2.96	3.24	3.50	3.76	4.00	4.21	2.96	3.24	3.52	3.78	4.03	4.27	4.49
	13	2.68	2.96	3.24	3.50	3.76	4.00	4.21	2.96	3.24	3.52	3.78	4.03	4.27	4.49
	14	2.11	2.31	2.51	2.69	2.88	3.05	3.22	2.31	2.51	2.71	2.89	3.08	3.25	3.43
	15	1.76	1.93	2.09	2.25	2.40	2.55	2.69	1.93	2.10	2.26	2.42	2.57	2.72	2.86
	16	1.43	1.57	1.70	1.83	1.95	2.08	2.18	1.56	1.70	1.84	1.97	2.09	2.21	2.32
	17	1.09	1.20	1.30	1.39	1.48	1.57	1.65	1.20	1.31	1.41	1.50	1.59	1.68	1.77
	18	0.76	0.82	0.88	0.95	1.01	1.06	1.12	0.82	0.88	0.95	1.01	1.08	1.13	1.18
	19	0.39	0.42	0.45	0.49	0.52	0.55	0.57	0.42	0.46	0.49	0.52	0.55	0.58	0.61
	20														
	21	0.38	0.42	0.45	0.48	0.51	0.54	0.57	0.41	0.45	0.48	0.51	0.54	0.57	0.60
	22	0.78	0.84	0.90	0.96	1.02	1.07	1.13	0.84	0.90	0.96	1.02	1.08	1.14	1.19
	23	1.19	1.28	1.38	1.47	1.55	1.64	1.72	1.29	1.39	1.48	1.57	1.65	1.74	1.82
	24	1.60	1.72	1.83	1.95	2.06	2.18	2.29	1.73	1.85	1.96	2.08	2.19	2.31	2.42
	25	2.02	2.16	2.31	2.46	2.60	2.74	2.88	2.18	2.32	2.47	2.62	2.76	2.90	3.04
	26	2.44	2.62	2.79	2.96	3.12	3.28	3.43	2.53	2.81	2.97	3.15	3.31	3.47	3.62
	27	2.88	3.08	3.27	3.42	3.66	3.84	4.01	3.10	3.30	3.47	3.69	3.88	4.06	4.23
	28	3.31	3.54	3.78	4.00	4.22	4.44	4.64	3.56	3.79	4.03	4.25	4.47	4.69	4.89
	29	3.78	4.03	4.27	4.52	4.76	4.99	5.21	4.06	4.31	4.55	4.80	5.04	5.27	5.48
	30	4.24	4.51	4.80	5.08	5.36	5.61	5.86	4.54	4.82	5.11	5.39	5.66	5.91	6.16

ТАБЛИЦА V

Температурные поправки, c, необходимые для плотности сухих вин и безалкогольных сухих вин, измеряемой с помощью обычного стеклянного пикнометра или ареометра при *t* °C. Чтобы внести поправку на 20 °C

- если *t* °C ниже, чем 20 °C
+ если *t* °C выше, чем 20 °C

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

Температура °C	Алкогольная крепость																								
	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13 | 14 | 15			16	17	18	19 | 20 | 21			22	23	24	25 | 26		27
10	1.45	1.51	1.55	1.58	1.64	1.76	1.78	1.89	1.98	2.09	2.21	2.34	2.47	2.60	2.75	2.93	3.06	3.22	3.39	3.57	3.75	3.93	4.12	4.31
11	1.35	1.40	1.43	1.47	1.52	1.58	1.65	1.73	1.83	1.93	2.03	2.15	2.26	2.38	2.51	2.65	2.78	2.93	3.08	3.24	3.40	3.57	3.73	3.90
12	1.24	1.28	1.31	1.34	1.39	1.44	1.50	1.58	1.66	1.75	1.84	1.94	2.04	2.15	2.26	2.38	2.51	2.63	2.77	2.91	3.05	3.19	3.34	3.49
13	1.12	1.16	1.18	1.21	1.25	1.30	1.35	1.42	1.49	1.56	1.64	1.73	1.82	1.91	2.01	2.11	2.22	2.33	2.45	2.57	2.69	2.81	2.95	3.07
14	0.99	1.03	1.05	1.07	1.11	1.14	1.19	1.24	1.31	1.37	1.44	1.52	1.59	1.67	1.75	1.84	1.93	2.03	2.13	2.23	2.33	2.44	2.55	2.66
15	0.86	0.89	0.90	0.92	0.95	0.98	1.02	1.07	1.12	1.17	1.23	1.29	1.35	1.42	1.49	1.56	1.63	1.71	1.80	1.88	1.96	2.05	2.14	2.23
16	0.71	0.73	0.74	0.76	0.78	0.81	0.84	0.87	0.91	0.95	0.99	1.05	1.10	1.15	1.21	1.27	1.33	1.39	1.45	1.52	1.59	1.66	1.73	1.80
17	0.55	0.57	0.57	0.59	0.60	0.62	0.65	0.67	0.70	0.74	0.77	0.81	0.84	0.88	0.92	0.96	1.01	1.05	1.10	1.15	1.20	1.26	1.31	1.36
18	0.38	0.39	0.39	0.40	0.41	0.43	0.44	0.46	0.48	0.50	0.52	0.55	0.57	0.60	0.62	0.65	0.68	0.71	0.74	0.78	0.81	0.85	0.88	0.91
19	0.19	0.20	0.20	0.21	0.21	0.22	0.23	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28	0.29	0.30	0.32	0.33	0.34	0.36	0.38	0.39	0.41	0.43	0.44	0.46
20																								
21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.24	0.25	0.25	0.26	0.27	0.28	0.29	0.31	0.32	0.34	0.35	0.36	0.38	0.39	0.41	0.43	0.44	0.46	0.48
22	0.43	0.45	0.45	0.46	0.47	0.49	0.50	0.52	0.54	0.56	0.58	0.60	0.62	0.65	0.68	0.71	0.73	0.77	0.80	0.83	0.86	0.89	0.93	0.96
23	0.67	0.69	0.70	0.71	0.72	0.74	0.77	0.79	0.82	0.85	0.88	0.91	0.95	0.99	1.03	1.07	1.12	1.16	1.21	1.25	1.30	1.35	1.40	1.45
24	0.91	0.93	0.95	0.97	0.99	1.01	1.04	1.07	1.11	1.15	1.20	1.24	1.29	1.34	1.39	1.45	1.50	1.56	1.62	1.69	1.76	1.82	1.88	1.95
25	1.16	1.19	1.21	1.23	1.26	1.29	1.33	1.37	1.42	1.47	1.52	1.57	1.63	1.70	1.76	1.83	1.90	1.97	2.05	2.13	2.21	2.29	2.37	2.45
26	1.42	1.46	1.49	1.51	1.54	1.58	1.62	1.67	1.73	1.79	1.85	1.92	1.99	2.07	2.14	2.22	2.31	2.40	2.49	2.58	2.67	2.77	2.86	2.96
27	1.69	1.74	1.77	1.80	1.83	1.88	1.93	1.98	2.05	2.12	2.20	2.27	2.35	2.44	2.53	2.63	272	2.82	2.93	3.04	3.14	3.25	3.37	3.48
28	1.97	2.03	2.06	2.09	2.14	2.19	2.24	2.31	2.38	2.46	2.55	2.63	2.73	2.83	2.93	3.03	3.14	3.26	3.38	3.50	3.62	3.75	3.85	4.00
29	2.26	2.33	2.37	2.41	2.45	2.50	2.57	2.64	2.73	2.82	2.91	2.99	3.11	3.22	3.34	3.46	3.58	3.70	3.84	3.97	4.11	4.25	4.39	4.54
30	2.56	2.64	2.67	2.72	2.77	2.83	2.90	2.98	3.08	3.18	3.28	3.38	3.50	3.62	3.75	3.88	4.02	4.16	4.30	4.46	4.61	4.76	4.92	5.07

Примечание: Эту таблицу можно использовать для преобразования плотности от d_{20}^{t} до d_{20}^{20}

ТАБЛИЦА VI

Температурные поправки, c, необходимые для плотности концентрированных сусел,
измеряемой с помощью обычного стеклянного пикнометра или ареометра при t °C. Чтобы внести поправку на 20 °C.

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

- если *t* °C ниже, чем 20 °C
+ если *t* °C выше, чем 20 °C

Температура °C	Плотность																						
	1.05	1.06	1.07	1.08	1.09	1.10	1.11	1.12	1.13	1.14	1.15	1.16	1.18	1.20	1.22	1.24	1.26	1.28	1.30	1.32	1.34	1.36
10	2.17	2.34	2.52	2.68	2.85	2.99	3.16	3.29	3.44	3.58	3.73	3.86	4.13	4.36	4.60	4.82	5.02	5.25	5.39	5.56	-5.73	5.87
11	2.00	2.16	2.29	2.44	2.59	2.73	2.86	2.99	3.12	3.24	3.37	3.48	3.71	3.94	4.15	4.33	4.52	4.69	4.85	5.01	5.15	5.29
12	1.81	1.95	2.08	2.21	2.34	2.47	2.58	2.70	2.82	2.92	3.03	3.14	3.35	3.55	3.72	3.90	4.07	4.23	4.37	4.52	4.64	4.77
13	1.62	1.74	1.85	1.96	2.07	2.17	2.28	2.38	2.48	2.59	2.68	2.77	2.94	3.11	3.28	3.44	3.54	3.72	3.86	3.99	4.12	4.24
14	1.44	1.54	1.64	1.73	1.82	1.92	2.00	2.08	2.17	2.25	2.34	2.42	2.57	2.73	2.86	2.99	3.12	3.24	3.35	3.46	3.57	3.65
15	1.21	1.29	1.37	1.45	1.53	1.60	1.68	1.75	1.82	1.89	1.97	2.03	2.16	2.28	2.40	2.51	2.61	2.71	2.80	2.89	2.94	3.01
16	1.00	1.06	1.12	1.19	1.25	1.31	1.37	1.43	1.49	1.54	1.60	1.65	1.75	1.84	1.94	2.02	2.09	2.17	2.23	2.30	2.36	2.42
17	0.76	0.82	0.86	0.91	0.96	1.00	1.05	1.09	1.14	1.18	1.22	1.25	1.32	1.39	1.46	1.52	1.57	1.63	1.67	1.71	1.75	1.79
18	0.53	0.56	0.59	0.63	0.65	0.69	0.72	0.74	0.77	0.80	0.82	0.85	0.90	0.95	0.99	1.02	1.05	1.09	1.13	1.16	1.18	1.20
19	0.28	0.30	0.31	0.33	0.35	0.36	0.38	0.39	0.41	0.42	0.43	0.43	0.46	0.48	0.50	0.52	0.54	0.55	0.57	0.58	0.59	0.60
20																						
21	0.28	0.29	0.31	0.33	0.34	0.36	0.37	0.39	0.40	0.41	0.43	0.44	0.46	0.48	0.51	0.54	0,56	0.57	0.58	0.59	0.60	0.60
22	0.55	0.58	0.61	0.64	0.67	0.70	0.73	0.76	0.78	0.81	0.84	0.87	0.93	0.97	1.02	1.06	1.09	1.12	1.15	1.17	1.19	1.19
23	0.85	0.90	0.95	0.99	1.04	1.08	1.12	1.16	1.21	1.25	1.29	1.32	1.39	1.46	1.52	1.58	1.62	1.68	1.72	1.75	1.77	1.79
24	1.15	1.19	1.25	1.31	1.37	1.43	1.48	1.54	1.60	1.65	1.71	1.76	1.86	1.95	2.04	2.11	2.17	2.23	2.29	2.33	2.35	2.37
25	1.44	1.52	1.59	1.67	1.74	1.81	1.88	1.95	2.02	2.09	2.16	2.22	2.34	2.45	2.55	2.64	2.74	2.81	7.87	2.90	2.92	2.96
26	1.76	1.84	1.93	2.02	2.10	2.18	2.25	2.33	2.41	2.49	2.56	2.64	2.78	2.91	3.03	3.15	3.26	3.37	3.47	3.55	3.62	3.60
27	2.07	2.16	2.26	2.36	2.46	2.56	2.65	2.74	2.83	2.91	3.00	3.07	3.24	3.39	3.55	3.69	3.82	3.94	4.04	4.14	4.23	4.30
28	2.39	2.51	2.63	2.74	2.85	2.96	3.06	3.16	3.28	3.38	3.48	3.57	3.75	3.92	4.08	4.23	4.37	4.51	4.62	4.73	4.80	4.86
29	2.74	2.86	2.97	3.09	3.22	3.34	3.46	3.57	3.69	3.90	3.90	4.00	4.20	4.39	4.58	4.74	4.90	5.05	5.19	5.31	5.40	5.48
30	3.06	3.21	3.35	3.50	3.63	3.77	3.91	4.02	4.15	4.28	4.40	4.52	4.75	4.96	5.16	5.35	5.52	5.67	5.79	5.91	5.99	6.04

Примечание: Эту таблицу можно использовать для преобразования плотности от d_{20}^{t} до d_{20}^{20}

ТАБЛИЦА VII

Температурные поправки, *c*, необходимые для плотности ликерных вин,
измеряемой пикнометром из обычного стекла или ареометром при t°C, чтобы внести поправку на 20°C.

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

- если *t* °C ниже, чем 20 °C
+ если *t* °C выше, чем 20 °C

		13% об. вина							15% об. вина							17% об. вина						
		Плотность							Плотность							Плотность						
		1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120	1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120	1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120
Температура °C	10	2.24	2.58	2.93	3.27	3.59	3.89	4.18	2.51	2.85	3.20	3.54	3.85	4.02	4.46	2.81	3.15	3.50	3.84	4.15	4.45	4.74
	11	2.06	2.37	2.69	2.97	3.26	3.53	3.78	2.31	2.61	2.93	3.21	3.51	3.64	4.02	2.57	2.89	3.20	3.49	3.77	4.03	4.28
	12	1.87	2.14	2.42	2.67	2.94	3.17	3.40	2.09	2.36	2.64	2.90	3.16	3.27	3.61	2.32	2.60	2.87	3.13	3.39	3.63	3.84
	13	1.69	1.93	2.14	2.37	2.59	2.80	3.00	1.88	2.12	2.34	2.56	2.78	2.88	3.19	2.09	2.33	2.55	2.77	2.98	3.19	3.39
	14	1.49	1.70	1.90	2.09	2.27	2.44	2.61	1.67	1.86	2.06	2.25	2.45	2.51	2.77	1.83	2.03	2.23	2.42	2.61	2.77	2.94
	15	1.25	1.42	1.59	1.75	1.90	2.05	2.19	1.39	1.56	1.72	1.88	2.03	2.11	2.32	1.54	1.71	1.87	2.03	2.18	2.32	2.47
	16	1.03	1.17	1.30	1.43	1.55	1.67	1.78	1.06	1.27	1.40	1.53	1.65	1.77	1.88	1.25	1.39	1.52	1.65	1.77	1.89	2.00
	17	0,80	0.90	1.00	1.09	1.17	1.27	1.36	0.87	0.98	1.08	1.17	1.26	1.35	1.44	0.96	1.06	1.16	1.26	1.35	1.44	1.52
	18	0.54	0.61	0.68	0.75	0,81	0.86	0.92	0.60	0.66	0.73	0.80	0.85	0.91	0.97	0.66	0.72	0.79	0.86	0.92	0,97	1.03
	19	0.29	0.33	0.36	0.39	0.42	0.45	0.48	0.32	0.36	0.39	0.42	0.45	0.48	0.51	0.35	0.38	0.41	0.45	0.48	0.51	0.53
	20																					
	21	0.29	0.32	0.35	0.39	0.42	0.45	0,47	0.32	0.35	0.38	0.42	0.45	0.48	0.50	0.34	0.38	0.41	0.44	0.47	0,50	0.53
	22	0.57	0.64	0.70	0.76	0.82	0.88	0.93	0.63	0.69	0.75	0.81	0.87	0.93	0.99	0.68	0,75	0.81	0.87	0.93	0.99	1.04
	23	0.89	0,98	1.08	1.17	1.26	1.34	1.43	0,97	1.06	1.16	1.25	1.34	1.42	1.51	1.06	1.15	1.25	1.34	1.42	1.51	1.59
	24	1.22	1.34	1.44	1.56	1.68	1.79	1.90	1.32	1.44	1.54	1.66	1.78	1.89	2.00	1.43	1.56	1.65	1.77	1.89	2.00	2.11
	25	1.61	1.68	1.83	1.98	2.12	2.26	2.40	1.66	1.81	1.96	2.11	2.25	2.39	2.52	1.80	1.94	2.09	2.24	2.39	2.52	2.66
	26	1.87	2.05	2.22	2.40	2.56	2.71	2.87	2.02	2.20	2.37	2.54	2.70	2.85	3.01	2.18	2.36	2.53	2.71	2.86	3.02	3.17
	27	2.21	2.42	2.60	2.80	3.00	3.18	3.35	2.39	2.59	2.78	2.98	3.17	3.35	3.52	2.58	2.78	2.97	3.17	3.36	3.54	3.71
	28	2.56	2.80	3.02	3.25	3.47	3.67	3.89	2.75	2.89	3.22	3.44	3.66	3.96	4.07	2.97	3.21	3.44	3.66	3.88	4.09	4.30
	29	2.93	3.19	3.43	3.66	3.91	4.14	4.37	3.16	3.41	3.65	3.89	4.13	4.36	4.59	3.40	3.66	3.89	4.13	4.38	4.61	4.82
	30	3.31	3.57	3.86	4.15	4.41	4.66	4.92	3.55	3.81	4.10	4.38	4.66	4.90	5.16	3.82	4.08	4.37	4.65	4.93	5.17	5.42

ТАБЛИЦА VII (продолжение)

Температурные поправки, *c*, необходимые для плотности ликерных вин,
измеряют с помощью обычного стеклянного пикнометра или ареометра при t °C, чтобы внести поправку на 20°C.

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

- если *t* °C ниже, чем 20 °C
+ если *t* °C выше, чем 20 °C

		19% об. вина							21% об. вина						
		Плотность							Плотность						
		1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120	1.000	1.020	1.040	1.060	1.080	1.100	1.120
Температура °C	10	3.14	3.48	3.83	4.17	4.48	4.78	5.07	3.50	3.84	4.19	4.52	4.83	5.12	5.41
	11	2.87	3.18	3.49	3.78	4.06	4.32	4.57	3.18	3.49	3.80	4.09	4.34	4.63	4.88
	12	2.58	2.96	3.13	3.39	3.65	3.88	4.10	2.86	3.13	3.41	3.67	3.92	4.15	4.37
	13	2.31	2.55	2.77	2.99	3.20	3.41	3.61	2.56	2.79	3.01	3.23	3.44	3.65	3.85
	14	2.03	2.23	2.43	2.61	2.80	2.96	3.13	2.23	2.43	2.63	2.81	3.00	3.16	3.33
	15	1.69	1.86	2.02	2.18	2.33	2.48	2.62	1.86	2.03	2.19	2.35	2.50	2.65	2.80
	16	1.38	1.52	1.65	1.78	1.90	2.02	2.13	1.51	1.65	1.78	1.91	2.03	2.15	2.26
	17	1.06	1.16	1.26	1 .35	1.44	1.53	1.62	1.15	1.25	1.35	1.45	1.54	1.63	1.71
	18	0,73	0.79	0.85	0.92	0.98	1.03	1.09	0.79	0.85	0.92	0.98	1.05	1.10	1.15
	19	0.38	0.41	0.44	0.48	0.51	0.52	0.56	0.41	0.44	0.47	0.51	0.54	0.57	0.59
	20														
	21	0.37	0.41	0.44	0.47	0.50	0.53	0.56	0.41	0.44	0.47	0.51	0.54	0.57	0.59
	22	0.75	0.81	0.87	0.93	0.99	1.04	1.10	0.81	0.88	0.94	1.00	1.06	1.10	1.17
	23	1.15	1.30	1.34	1.43	1.51	1.60	1.68	1.25	1.34	1.44	1.63	1.61	1.70	1.78
	24	1.55	1.67	1.77	1.89	2.00	2.11	2.23	1.68	1.80	1.90	2.02	2.13	2.25	2.36
	25	1.95	2.09	2.24	2.39	2.53	2.67	2.71	2.11	2.25	2.40	2.55	2.69	2.83	2.97
	26	2.36	2.54	2.71	2.89	3.04	3.20	3.35	2.55	2.73	2.90	3.07	3.22	3.38	3.54
	27	2.79	2.99	3.18	3.38	3.57	3.75	3.92	3.01	3.20	3.40	3.59	3.78	3.96	4.13
	28	3.20	3.44	3.66	3.89	4.11	4.32	4.53	3.46	3.69	3.93	4.15	4.36	4.58	4.77
	29	3.66	3.92	4.15	4.40	4.64	4.87	5.08	3.95	4.20	4.43	4.68	4.92	5.15	5.36
	30	4.11	4.37	4.66	4.94	5.22	5.46	5.71	4.42	4.68	4.97	5.25	5.53	5.77	6.02

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Сравнение результатов для методов измерения плотности с помощью генератора частоты (метод B) и с использованием гидростатических весов (метод C)

Используя образцы с плотностью от 0.992 до 1.012 г/см3, повторяемость и воспроизводимость измеряли с помощью межлабораторного теста. Были сопоставлены плотности различных образцов, которые измеряют с помощью гидростатических весов и электронной денсиметрии, включая значения повторяемости и воспроизводимости, полученные в результате многолетних сравнительных испытаний, проведенных в больших масштабах.

1 Образцы
Вина с различной плотностью и крепостью спирта, которые ежемесячно производятся в промышленных масштабах, отбираются из запаса бутылок, хранящихся в нормальных условиях, и анонимно поставляются в лаборатории.
2 Лаборатории
Лаборатории, участвующие в ежемесячных тестах, организованны *Unione Italiana Vini* (Верона, Италия) в соответствии со стандартами ISO 5725 (UNI 9225) и Международным гармонзированным протоколом проверки квалификации аналитических химических лабораторий, разработанным AOAC, Международной организацией по стандартизации ISO и Международным союзом теоретической и прикладной химии IUPAC, и ISO 43 и рекомендациями Международной ассоциации по аккредитации ILAC G13. Ежегодный отчет предоставляется вышеуказанной организацией всем участникам.

3 Используемая аппаратура

3.1 Электронные гидростатические весы (с точностью до 5 знаков после запятой), снабженные, по возможности, устройством обработки данных.

3.2 Электронный плотномер, по возможности оснащенный автодозатором.

4 Анализ
Согласно правилам валидации методов анализа каждый образец анализировали два раза подряд для определения крепости спирта.

5 Результаты

В таблице 1 приведены результаты измерений, полученные лабораториями с использованием гидростатических весов.
В таблице 2 представлены результаты, полученные лабораториями с использованием электронного плотномера.

6 Оценка результатов

6.1 Результаты теста были проверены на наличие индивидуальной системной ошибки ($p<0.025$) с последовательным использованием тестов Кохрена и Граббса в соответствии с процедурами, описанными в международно признанном Протоколе планирования, проведения и интерпретации исследований эффективности метода.

6. *Повторяемость (r) и воспроизводимость (R)*

Расчеты повторяемости (r) и воспроизводимости (R), как определено протоколом, проводились на результатах, оставшихся после удаления выбросов. При оценке нового метода часто отсутствует утвержденный эталонный или установленный законом метод для сравнения критериев прецизионности; таким образом «прогнозируемые» уровни прецизионности используются для сравнения данных о прецизионности, полученных в результате совместных испытаний. Эти прогнозируемые уровни рассчитываются по формуле Горвица. Сравнение результатов теста и прогнозируемых уровней дает представление о том, является ли метод достаточно точным для измеряемого уровня аналита. Прогнозируемый коэффициент Горвица рассчитывается по уравнению Горвица.

$RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)}$

где C представляет собой измеренную концентрацию аналита, выраженную в виде десятичной дроби (например, 1 г/100 г = 0.01).

Коэффициент Горвица дает сравнение фактической измеренной точности с достоверностью, предсказанной формулой Горвица для данного метода и при определенном уровне концентрации аналита. Он рассчитывается следующим образом:

6.3 *Межлабораторная воспроизводимость*

Коэффициент Горвица, равный 1, обычно указывает на удовлетворительную воспроизводимость, тогда как значение более 2 обычно указывает на неудовлетворительную воспроизводимость, т.е. слишком вариативную для аналитических целей или полученная вариация больше, чем прогнозируется для типа используемого метода. Кроме того, коэффициент Горвица рассчитывается и используется для измерения внутрилабораторной воспроизводимости с использованием следующей приближённой формулы:

RSD_r(Горвиц) = 0.66 RSD_R(Горвиц) (это позволяет предположить, что

r = 0.66 R)

CrD95 является критической разницей для уровня вероятности 95%. Он рассчитывается в соответствии к Резолюции OIV-MA-AS1-08.

В таблице 3 представлены различия между измерениями, полученными в лабораториях с использованием электронного денсиметра и с помощью гидростатических весов.

6.4 *Параметры прецизионности*

В таблице 4 представлены общие средние значения параметров прецизионности, рассчитанные по результатам всех ежемесячных испытаний, проведенных в период с января 2008 г. по декабрь 2010 г.

Таблица 1: результаты, полученные лабораториями,
проводившими испытания с использованием гидростатических весов (ГВ)

Образец	Среднее	Общее кол-во ценностей	Кол-во искомых значений	Повторя-	sr	RSDr	Hor	Воспроиз-	sR	RSDRcalc	HoR	Кол-во повторений	CrD95
01/08	0.995491	130	120	0.0001701	0.0000607	0.0061016	0.0046193	0.0005979	0.0002135	0.0214502	0.0107178	2	0.0004141
02/08	1.011475	146	125	0.0004714	0.0001684	0.0166457	0.0126320	0.0008705	0.0003109	0.0307366	0.0153947	2	0.0005686
03/08	0.992473	174	161	0.0001470	0.0000525	0.0052898	0.0040029	0.0004311	0.0001540	0.0155140	0.0077482	2	0.0002959
04/08	0.993147	172	155	0.0002761	0.0000986	0.0099274	0.0075130	0.0005446	0.0001945	0.0195839	0.0097818	2	0.0003595
05/08	1.004836	150	138	0.0001882	0.0000672	0.0066905	0.0050723	0.0007495	0.0002677	0.0266373	0.0133283	2	0.0005215
06/08	0.993992	152	136	0.0001486	0.0000531	0.0053391	0.0040411	0.0005302	0.0001894	0.0190506	0.0095167	2	0.0003675
07/08	0.992447	162	150	0.0002660	0.0000950	0.0095709	0.0072424	0.0006046	0.0002159	0.0217575	0.0108664	2	0.0004063
08/08	0.992210	162	151	0.0002619	0.0000935	0.0094281	0.0071341	0.0006309	0.0002253	0.0227108	0.0113420	2	0.0004265
09/08	1.002600	148	131	0.0001093	0.0000390	0.0038920	0.0029496	0.0007000	0.0002500	0.0249341	0.0124719	2	0.0004919
10/08	0.994482	174	152	0.0001228	0.0000439	0.0044105	0.0033385	0.0004250	0.0001518	0.0152645	0.0076259	2	0.0002942
11/08	0.992010	136	125	0.0000909	0.0000325	0.0032742	0.0024775	0.0004256	0.0001520	0.0153217	0.0076516	2	0.0002975
01/09	0.994184	174	152	0.0001655	0.0000591	0.0059435	0.0044987	0.0005439	0.0001942	0.0195384	0.0097606	2	0.0003756
02/09	0.992266	118	101	0.0001742	0.0000622	0.0062682	0.0047431	0.0005210	0.0001861	0.0187534	0.0093658	2	0.0003580
03/09	0.991886	164	135	0.0001850	0.0000661	0.0066603	0.0050395	0.0004781	0.0001707	0.0172136	0.0085963	2	0.0003251
04/09	0.993632	180	150	0.0001523	0.0000544	0.0054754	0.0041440	0.0004270	0.0001525	0.0153476	0.0076664	2	0.0002922
05/09	1.011061	116	100	0.0003659	0.0001307	0.0129234	0.0098067	0.0008338	0.0002978	0.0294527	0.0147508	2	0.0005605
06/09	0.992063	114	105	0.0002923	0.0001044	0.0105238	0.0079631	0.0005257	0.0001877	0.0189240	0.0094507	2	0.0003418
07/09	0.992708	172	155	0.0002892	0.0001033	0.0104040	0.0078732	0.0006156	0.0002199	0.0221478	0.0110617	2	0.0004106
08/09	0.993064	136	127	0.0002926	0.0001045	0.0105224	0.0079632	0.0007520	0.0002686	0.0270446	0.0135081	2	0.0005112
09/09	1.005285	118	110	0.0002946	0.0001052	0.0104661	0.0079352	0.0007226	0.0002581	0.0256704	0.0128454	2	0.0004892
10/09	0.992905	150	132	0.0002234	0.0000798	0.0080358	0.0060812	0.0004498	0.0001607	0.0161803	0.0080815	2	0.0002978
11/09	0.994016	142	127	0.0001896	0.0000677	0.0068114	0.0051555	0.0004739	0.0001693	0.0170278	0.0085062	2	0.0003214
01/10	0.994734	170	152	0.0002125	0.0000759	0.0076288	0.0057748	0.0005406	0.0001931	0.0194104	0.0096975	2	0.0003672
02/10	0.993177	120	110	0.0002210	0.0000789	0.0079467	0.0060140	0.0005800	0.0002071	0.0208565	0.0104175	2	0.0003950
03/10	0.992799	148	136	0.0002277	0.0000813	0.0081923	0.0061995	0.0015157	0.0005413	0.0545262	0.0272335	2	0.0010657
04/10	0.995420	172	157	0.0002644	0.0000944	0.0094866	0.0071819	0.0006286	0.0002245	0.0225542	0.0112693	2	0.0004244
05/10	1.002963	120	108	0.0007086	0.0002531	0.0252330	0.0191244	0.0013667	0.0004881	0.0486677	0.0243447	2	0.0008991
06/10	0.992546	120	113	0.0001737	0.0000620	0.0062506	0.0047300	0.0005435	0.0001941	0.0195567	0.0097673	2	0.0003744
07/10	0.992831	174	152	0.0003003	0.0001073	0.0108031	0.0081753	0.0006976	0.0002492	0.0250959	0.0125344	2	0.0004699
08/10	0.993184	144	130	0.0001799	0.0000642	0.0064674	0.0048945	0.0005951	0.0002125	0.0213984	0.0106882	2	0.0004111
09/10	1.012293	114	103	0.0002265	0.0000809	0.0079907	0.0060647	0.0014586	0.0005209	0.0514596	0.0257772	2	0.0010251
10/10	0.992289	154	136	0.0006386	0.0002281	0.0229860	0.0173933	0.0007033	0.0002512	0.0253124	0.0126415	2	0.0003812
11/10	0.994649	130	112	0.0002902	0.0001036	0.0104200	0.0078876	0.0005287	0.0001888	0.0189830	0.0094838	2	0.0003445

Таблица 2: результаты, полученные лабораториями, проводившими испытания с использованием электронного денсиметра (ЭД)

Образец	Среднее значение	Общее кол-во *значений*	Повторя-емость	Повторя-	s_r	RSD_r	Hor	Воспроиз-водимость	sR	RSDRcalc	HoR	Кол-во повтор	CrD95
01/08	0.995504	114	108	0.0000755	0.0000270	0.0027085	0.0020505	0.0001571	0.0000561	0.0056361	0.0028162	2	0.0001045
02/08	1.011493	132	125	0.0001921	0.0000686	0.0067837	0.0051480	0.0004435	0.0001584	0.0156582	0.0078426	2	0.0002985
03/08	0.992491	138	118	0.0000746	0.0000266	0.0026830	0.0020303	0.0002745	0.0000980	0.0098776	0.0049332	2	0.0001905
04/08	0.993129	132	120	0.0001230	0.0000439	0.0044247	0.0033486	0.0002863	0.0001023	0.0102965	0.0051429	2	0.0001929
05/08	1.004892	136	116	0.0000926	0.0000331	0.0032893	0.0024937	0.0004777	0.0001706	0.0169785	0.0084955	2	0.0003346
06/08	0.994063	142	123	0.0000558	0.0000199	0.0020051	0.0015177	0.0001776	0.0000634	0.0063791	0.0031867	2	0.0001224
07/08	0.992498	136	125	0.0000822	0.0000294	0.0029576	0.0022381	0.0002094	0.0000748	0.0075368	0.0037641	2	0.0001423
08/08	0.992270	130	115	0.0000515	0.0000184	0.0018537	0.0014027	0.0001665	0.0000595	0.0059940	0.0029935	2	0.0001149
09/08	1.002603	136	121	0.0000821	0.0000293	0.0029236	0.0022157	0.0003328	0.0001189	0.0118565	0.0059306	2	0.0002318
10/08	**0.994493**	**128**	**117**	**0.0000667**	**0.0000238**	**0.0023954**	**0.0018132**	**0.0001429**	**0.0000510**	**0.0051309**	**0.0025633**	**2**	**0.0000954**
11/08	0.992017	118	104	0.0000842	0.0000301	0.0030309	0.0022933	0.0001962	0.0000701	0.0070644	0.0035279	2	0.0001322
01/09	0.994216	148	131	0.0000830	0.0000297	0.0029832	0.0022580	0.0001551	0.0000554	0.0055712	0.0027832	2	0.0001015
02/09	0.992251	104	88	0.0000947	0.0000338	0.0034097	0.0025801	0.0002846	0.0001017	0.0102451	0.0051165	2	0.0001956
03/09	0.991875	126	108	0.0001271	0.0000454	0.0045777	0.0034637	0.0002067	0.0000738	0.0074421	0.0037165	2	0.0001316
04/09	0.993654	134	114	0.0001166	0.0000416	0.0041899	0.0031711	0.0002043	0.0000730	0.0073417	0.0036673	2	0.0001322
05/09	1.011035	128	104	0.0002388	0.0000853	0.0084361	0.0064016	0.0003554	0.0001269	0.0125542	0.0062875	2	0.0002211
06/09	0.992104	116	106	0.0001005	0.0000359	0.0036178	0.0027375	0.0003169	0.0001132	0.0114088	0.0056976	2	0.0002184
07/09	0.992720	144	140	0.0001579	0.0000564	0.0056815	0.0042995	0.0002916	0.0001042	0.0104923	0.0052404	2	0.0001905
08/09	0.993139	110	102	0.0001175	0.0000420	0.0042242	0.0031969	0.0003603	0.0001287	0.0129577	0.0064721	2	0.0002479
09/09	1.005276	112	108	0.0001100	0.0000393	0.0039070	0.0029622	0.0003522	0.0001258	0.0125134	0.0062617	2	0.0002429
10/09	0.992912	122	111	0.0000705	0.0000252	0.0025365	0.0019195	0.0002122	0.0000758	0.0076315	0.0038117	2	0.0001458
11/09	0.994031	128	118	0.0000718	0.0000256	0.0025784	0.0019516	0.0001639	0.0000585	0.0058883	0.0029415	2	0.0001102
01/10	0.994752	144	136	0.0000773	0.0000276	0.0027765	0.0021017	0.0001787	0.0000638	0.0064144	0.0032046	2	0.0001203
02/10	0.993181	108	98	0.0001471	0.0000525	0.0052893	0.0040029	0.0001693	0.0000605	0.0060884	0.0030410	2	0.0000945
03/10	0.992665	140	127	0.0001714	0.0000612	0.0061683	0.0046678	0.0002378	0.0000849	0.0085559	0.0042732	2	0.0001447
04/10	0.995502	142	128	0.0001175	0.0000419	0.0042138	0.0031901	0.0002320	0.0000829	0.0083248	0.0041596	2	0.0001532
05/10	1.002851	130	119	0.0001195	0.0000427	0.0042555	0.0032253	0.0002971	0.0001061	0.0105815	0.0052930	2	0.0002014
06/10	0.992607	106	99	0.0001228	0.0000438	0.0044172	0.0033427	0.0002226	0.0000795	0.0080092	0.0040001	2	0.0001449
07/10	0.992871	160	150	0.0001438	0.0000513	0.0051712	0.0039134	0.0003732	0.0001333	0.0134258	0.0067057	2	0.0002539
08/10	0.993235	104	93	0.0000895	0.0000320	0.0032182	0.0024356	0.0002458	0.0000878	0.0088399	0.0044154	2	0.0001680
09/10	1.012328	112	105	0.0000870	0.0000311	0.0030692	0.0023295	0.0003395	0.0001213	0.0119781	0.0060001	2	0.0002361
10/10	0.992308	128	115	0.0000606	0.0000216	0.0021811	0.0016504	0.0001635	0.0000584	0.0058845	0.0029388	2	0.0001116
11/10	0.994683	120	108	0.0001127	0.0000402	0.0040450	0.0030620	0.0001597	0.0000570	0.0057339	0.0028647	2	0.0000979

Таблица 3: Сравнение результатов гидростатических весов (ВН) и электронного денсиметра (ЭД)

Плотность - Гидростатическе весы				**Плотность - Генератор частоты**				**Сравнение**
	Среднее значение	Общее значение	Выбранное значение		Среднее значен	Общее значен	Выбранное значение	
01/08	0.995491	130	120	01/08	0.995504	114	108	-0.000013
02/08	1.011475	146	125	02/08	1.011493	132	125	-0.000018
03/08	0.992473	174	161	03/08	0.992491	138	118	-0.000018
04/08	0.993147	172	155	04/08	0.993129	132	120	0.000018
05/08	1.004836	150	138	05/08	1.004892	136	116	-0.000056
06/08	0.993992	152	136	06/08	0.994063	142	123	-0.000071
07/08	0.992447	162	150	07/08	0.992498	136	125	-0.000051
08/08	0.992210	162	151	08/08	0.992270	130	115	-0.000060
09/08	1.002600	148	131	09/08	1.002603	136	121	-0.000003
10/08	0.994482	174	152	10/08	0.994493	128	117	-0.000011
11/08	0.992010	136	125	11/08	0.992017	118	104	-0.000007
01/09	0.994184	174	152	01/09	0.994216	148	131	-0.000031
02/09	0.992266	118	101	02/09	0.992251	104	88	0.000015
03/09	0.991886	164	135	03/09	0.991875	126	108	0.000011
04/09	0.993632	180	150	04/09	0.993654	134	114	-0.000022
05/09	1.011061	116	100	05/09	1.011035	128	104	0.000026
06/09	0.992063	114	105	06/09	0.992104	116	106	-0.000041
07/09	0.992708	172	155	07/09	0.992720	144	140	-0.000012
08/09	0.993064	136	127	08/09	0.993139	110	102	-0.000075
09/09	1.005285	118	110	09/09	1.005276	112	108	0.000009
10/09	0.992905	150	132	10/09	0.992912	122	111	-0.000008
11/09	0.994016	142	127	11/09	0.994031	128	118	-0.000015
01/10	0.994734	170	152	01/10	0.994752	144	136	-0.000018
02/10	0.993177	120	110	02/10	0.993181	108	98	-0.000005
03/10	0.992799	148	136	03/10	0.992665	140	127	0.000134
04/10	0.995420	172	157	04/10	0.995502	142	128	-0.000082
05/10	1.002963	120	108	05/10	1.002851	130	119	0.000112
06/10	0.992546	120	113	06/10	0.992607	106	99	-0.000061
07/10	0.992831	174	152	07/10	0.992871	160	150	-0.000040
08/10	0.993184	144	130	08/10	0.993235	104	93	-0.000052
09/10	1.012293	114	103	09/10	1.012328	112	105	-0.000035
10/10	0.992289	154	136	10/10	0.992308	128	115	-0.000019

11/10	0.994649	130	112	11/10	0.994683	120	108	-0.000035
						средн.	$\Delta_{(BH-DE)}$	-0.0000162
						стандарт.	$\Delta_{(BH-DE)}$	

Таблица 4: Параметры прецизионности

	Гидростат. весы (HB)	*Электр. денсиметр (ED)*
Кол-во выранных значений	4347	3800
min.	0.99189 г/см^3	0.99187 г/см^3
max.	1.01229 г/см^3	1.01233 г/см^3
R	0.00067 г/см^3	0.00025 г/см^3
s_R	0.00024 г/см^3	0.000091 г/см^3
R%	0.067%	0.025%
r	0.00025 г/см^3	0.00011 г/см^3
s_r	0.000090 г/см^3	0.000038 г/см^3
r%	0.025%	0.011%

Обозначения:

n: *количество искомых значений*

min: нижний предел диапазона измерений

max: верхний предел диапазона измерений

r: повторяемость

s_r*: стандартное отклонение повторяемости*

6. БИБЛИОГРАФИЯ

JAULMES, P., *OIV Bulletin,* **26,** No. 274, 1953, p. 6.

JAULMES, P. and BRUN, S., *Trav. Soc. Pharm., Montpellier,* **16,** 1956, p.115;

20, 1960, p. 137; *Ann. Fals. Exp. Chim.,* **46,** 1963, pp. 129 and 143.

BRUN, S. and TEP, Y., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 37-40; OIV, FV, No. 539, 1975.

Метод OIV-MA-AS2-02 Метод I типа

Оценка рефрактометрией концентрации сахара в виноградном сусле, концентрированном виноградном сусле и ректификованном концентрированном виноградном сусле

(Oeno 21/2004)

(В редакции Oeno 466/2012)

1 Сущность метода

Показатель преломления при 20°C, выраженный либо как абсолютное значение, либо как процентное содержание сахарозы по массе, приведено в соответствующей таблице для обеспечения возможности получения концентрации сахара в граммах на литр и в граммах на килограмм.

2 Используемая аппаратура

Рефрактометр Abbe
Используемый рефрактометр должен быть снабжен шкалой, дающей:
- либо процентное содержание по массе сахарозы до 0.1%;
- либо показатели преломления с точностью до четырех знаков после запятой.

Рефрактометр должен быть оснащен термометром со шкалой не менее чем от +15°C до +25°C и системой циркуляции воды, позволяющей проводить измерения при температуре 20 ± 5°C. Инструкции по эксплуатации прибора должны строго соблюдаться, особенно в отношении калибровки и источника света.

3 Подготовка образца

3.1 *Сусло и концентрированное сусло*

Пропускают сусло при необходимости через сложенную вчетверо сухую марлю и, отбросив первые капли фильтрата, проводят измерение на отфильтрованном продукте.

3.2 *Ректифицированное концентрированное сусло*

В зависимости от концентрации используют либо само ректификованное концентрированное сусло, либо раствор, полученный путем доведения 200 г ректифицированного концентрированного сусла до 500 г. водой, все взвешивания выполняются точно.

4 Проведение исследования

Доводят образец до температуры, близкой к 20°C.
Помещают небольшой испытуемый образец на нижнюю призму рефрактометра, убедившись (так как призмы плотно прижаты друг к другу), что испытуемый образец равномерно покрывает поверхность стекла. Проводят измерение в соответствии с инструкцией по эксплуатации используемого прибора.

Считывают процентное содержание по массе сахарозы с точностью до 0.1 или считывают показатель преломления с точностью до четырех знаков после запятой.
Проводят не менее двух измерений на одном и том же подготовленном образце.
Отмечают температуру *t*°C.

5 *Расчеты*

5.1 *Температурные поправки*

- Приборы отградуированы в процентах по массе сахарозы: используют Таблицу I для получения температурной поправки.
- Приборы, отградуированные по показателю преломления: находят показатель, измеренный при *t*°C, в Таблице II, чтобы получить (столбец 1) соответствующее значение процентного содержания сахарозы по массе при *t*°C. Это значение скорректировано с учетом температуры и выражено в виде концентрации при 20°C с помощью Таблицы I.

5.2 *Концентрация сахара в сусле и концентрированном сусле*

Находят процентное содержание по массе сахарозы при 20°C в Таблице II и опредделяют из той же строки концентрацию сахара в граммах на литр и граммах на килограмм. Концентрация сахара выражается в пересчете на инвертный сахар с точностью до одного десятичного знака.

5.3 *Концентрация сахара в ректификованном концентрированном сусле*

Находят массовый процент сахарозы при 20°C в Таблице III и определяют из той же строки концентрацию сахара в граммах на литр и граммах на килограмм. Концентрация сахара выражается в пересчете на инвертный сахар с точностью до одного десятичного знака. Если измерение проводилось на разбавленном концентрированном ректифицированном сусле, умножают результат на коэффициент разбавления.

5.4 *Показатель преломления сусла, концентрированного сусла и ректифицированного концентрированного сусла*

Находят процентное содержание по массе сахарозы при 20°C в Таблице II и определяют из той же строки показатель преломления при 20°C. Этот индекс выражается с точностью до четырех знаков после запятой.

ТАБЛИЦА II

В таблице представлено содержание сахара в суслах и концентрированных суслах в граммах на литр и в граммах на килограмм, определяемое с помощью градуированного рефрактометра либо в процентах по массе сахарозы при 20°C, либо по показателю преломления при 20°C. Также указана массовая плотность.

Сахароза % (м/м)	Показатель преломления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
10.0	1.34782	1.0391	82.2	79.1	4.89
10.1	1.34798	1.0395	83.3	80.1	4.95
10.2	1.34813	1.0399	84.3	81.1	5.01
10.3	1.34829	1.0403	85.4	82.1	5.08
10.4	1.34844	1.0407	86.5	83.1	5.14
10.5	1.34860	1.0411	87.5	84.1	5.20
10.6	1.34875	1.0415	88.6	85.0	5.27
10.7	1.34891	1.0419	89.6	86.0	5.32
10.8	1.34906	1.0423	90.7	87.0	5.39
10.9	1.34922	1.0427	91.8	88.0	5.46
11.0	1.34937	1.0431	92.8	89.0	5.52
11.1	1.34953	1.0436	93.9	90.0	5.58
11.2	1.34968	1.0440	95.0	91.0	5.65
11.3	1.34984	1.0444	96.0	92.0	5.71
11.4	1.34999	1.0448	97.1	92.9	5.77
11.5	1.35015	1.0452	98.2	93.9	5.84
11.6	1.35031	1.0456	99.3	94.9	5.90
11.7	1.35046	1.0460	100.3	95.9	5.96
11.8	1.35062	1.0464	101.4	96.9	6.03
11.9	1.35077	1.0468	102.5	97.9	6.09
12.0	1.35093	1.0472	103.5	98.9	6.15
12.1	1.35109	1.0477	104.6	99.9	6.22
12.2	1.35124	1.0481	105.7	100.8	6.28
12.3	1.35140	1.0485	106.8	101.8	6.35
12.4	1.35156	1.0489	107.8	102.8	6.41
12.5	1.35171	1.0493	108.9	103.8	6.47
12.6	1.35187	1.0497	110.0	104.8	6.54
12.7	1.35203	1.0501	111.1	105.8	6.60
12.8	1.35219	1.0506	112.2	106.8	6.67
12.9	1.35234	1.0510	113.2	107.8	6.73
13.0	1.35250	1.0514	114.3	108.7	6.79
13.1	1.35266	1.0518	115.4	109.7	6.86
13.2	1.35282	1.0522	116.5	110.7	6.92
13.3	1.35298	1.0527	117.6	111.7	6.99
13.4	1.35313	1.0531	118.7	112.7	7.05
13.5	1.35329	1.0535	119.7	113.7	7.11
13.6	1.35345	1.0539	120.8	114.7	7.18
13.7	1.35361	1.0543	121.9	115.6	7.24
13.8	1.35377	1.0548	123.0	116.6	7.31
13.9	1.35393	1.0552	124.1	117.6	7.38
14.0	1.35408	1.0556	125.2	118.6	7.44
14.1	1.35424	1.0560	126.3	119.6	7.51
14.2	1.35440	1.0564	127.4	120.6	7.57
14.3	1.35456	1.0569	128.5	121.6	7.64
14.4	1.35472	1.0573	129.6	122.5	7.70
14.5	1.35488	1.0577	130.6	123.5	7.76
14.6	1.35504	1.0581	131.7	124.5	7.83
14.7	1.35520	1.0586	132.8	125.5	7.89
14.8	1.35536	1.0590	133.9	126.5	7.96
14.9	1.35552	1.0594	135.0	127.5	8.02

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
15.0	1.35568	1.0598	136.1	128.4	8.09
15.1	1.35584	1.0603	137.2	129.4	8.15
15.2	1.35600	1.0607	138.3	130.4	8.22
15.3	1.35616	1.0611	139.4	131.4	8.28
15.4	1.35632	1.0616	140.5	132.4	8.35
15.5	1.35648	1.0620	141.6	133.4	8.42
15.6	1.35664	1.0624	142.7	134.3	8.48
15.7	1.35680	1.0628	143.8	135.3	8.55
15.8	1.35696	1.0633	144.9	136.3	8.61
15.9	1.35713	1.0637	146.0	137.3	8.68
16.0	1.35729	1.0641	147.1	138.3	8.74
16.1	1.35745	1.0646	148.2	139.3	8.81
16.2	1.35761	1.0650	149.3	140.2	8.87
16.3	1.35777	1.0654	150.5	141.2	8.94
16.4	1.35793	1.0659	151.6	142.2	9.01
16.5	1.35810	1.0663	152.7	143.2	9.07
16.6	1.35826	1.0667	153.8	144.2	9.14
16.7	1.35842	1.0672	154.9	145.1	9.21
16.8	1.35858	1.0676	156.0	146.1	9.27
16.9	1.35874	1.0680	157.1	147.1	9.34
17.0	1.35891	1.0685	158.2	148.1	9.40
17.1	1.35907	1.0689	159.3	149.1	9.47
17.2	1.35923	1.0693	160.4	150.0	9.53
17.3	1.35940	1.0698	161.6	151.0	9.60
17.4	1.35956	1.0702	162.7	152.0	9.67
17.5	1.35972	1.0707	163.8	153.0	9.73
17.6	1.35989	1.0711	164.9	154.0	9.80
17.7	1.36005	1.0715	166.0	154.9	9.87
17.8	1.36021	1.0720	167.1	155.9	9.93
17.9	1.36038	1.0724	168.3	156.9	10.00
18.0	1.36054	1.0729	169.4	157.9	10.07
18.1	1.36070	1.0733	170.5	158.9	10.13
18.2	1.36087	1.0737	171.6	159.8	10.20
18.3	1.36103	1.0742	172.7	160.8	10.26
18.4	1.36120	1.0746	173.9	161.8	10.33
18.5	1.36136	1.0751	175.0	162.8	10.40
18.6	1.36153	1.0755	176.1	163.7	10.47
18.7	1.36169	1.0760	177.2	164.7	10.53
18.8	1.36185	1.0764	178.4	165.7	10.60
18.9	1.36202	1.0768	179.5	166.7	10.67
19.0	1.36219	1.0773	180.6	167.6	10.73
19.1	1.36235	1.0777	181.7	168.6	10.80
19.2	1.36252	1.0782	182.9	169.6	10.87
19.3	1.36268	1.0786	184.0	170.6	10.94
19.4	1.36285	1.0791	185.1	171.5	11.00
19.5	1.36301	1.0795	186.2	172.5	11.07
19.6	1.36318	1.0800	187.4	173.5	11.14
19.7	1.36334	1.0804	188.5	174.5	11.20
19.8	1.36351	1.0809	189.6	175.4	11.27
19.9	1.36368	1.0813	190.8	176.4	11.34

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель преломления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
20.0	1.36384	1.0818	191.9	177.4	11.40
20.1	1.36401	1.0822	193.0	178.4	11.47
20.2	1.36418	1.0827	194.2	179.3	11.54
20.3	1.36434	1.0831	195.3	180.3	11.61
20.4	1.36451	1.0836	196.4	181.3	11.67
20.5	1.36468	1.0840	197.6	182.3	11.74
20.6	1.36484	1.0845	198.7	183.2	11.81
20.7	1.36501	1.0849	199.8	184.2	11.87
20.8	1.36518	1.0854	201.0	185.2	11.95
20.9	1.36535	1.0858	202.1	186.1	12.01
21.0	1.36551	1.0863	203.3	187.1	12.08
21.1	1.36568	1.0867	204.4	188.1	12.15
21.2	1.36585	1.0872	205.5	189.1	12.21
21.3	1.36602	1.0876	206.7	190.0	12.28
21.4	1.36619	1.0881	207.8	191.0	12.35
21.5	1.36635	1.0885	209.0	192.0	12.42
21.6	1.36652	1.0890	210.1	192.9	12.49
21.7	1.36669	1.0895	211.3	193.9	12.56
21.8	1.36686	1.0899	212.4	194.9	12.62
21.9	1.36703	1.0904	213.6	195.9	12.69
22.0	1.36720	1.0908	214.7	196.8	12.76
22.1	1.36737	1.0913	215.9	197.8	12.83
22.2	1.36754	1.0917	217.0	198.8	12.90
22.3	1.36771	1.0922	218.2	199.7	12.97
22.4	1.36787	1.0927	219.3	200.7	13.03
22.5	1.36804	1.0931	220.5	201.7	13.10
22.6	1.36821	1.0936	221.6	202.6	13.17
22.7	1.36838	1.0940	222.8	203.6	13.24
22.8	1.36855	1.0945	223.9	204.6	13.31
22.9	1.36872	1.0950	225.1	205.5	13.38
23.0	1.36889	1.0954	226.2	206.5	13.44
23.1	1.36906	1.0959	227.4	207.5	13.51
23.2	1.36924	1.0964	228.5	208.4	13.58
23.3	1.36941	1.0968	229.7	209.4	13.65
23.4	1.36958	1.0973	230.8	210.4	13.72
23.5	1.36975	1.0977	232.0	211.3	13.79
23.6	1.36992	1.0982	233.2	212.3	13.86
23.7	1.37009	1.0987	234.3	213.3	13.92
23.8	1.37026	1.0991	235.5	214.2	14.00
23.9	1.37043	1.0996	236.6	215.2	14.06
24.0	1.37060	1.1001	237.8	216.2	14.13
24.1	1.37078	1.1005	239.0	217.1	14.20
24.2	1.37095	1.1010	240.1	218.1	14.27
24.3	1.37112	1.1015	241.3	219.1	14.34
24.4	1.37129	1.1019	242.5	220.0	14.41
24.5	1.37146	1.1024	243.6	221.0	14.48
24.6	1.37164	1.1029	244.8	222.0	14.55
24.7	1.37181	1.1033	246.0	222.9	14.62
24.8	1.37198	1.1038	247.1	223.9	14.69
24.9	1.37216	1.1043	248.3	224.8	14.76

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
25.0	1.37233	1.1047	249.5	225.8	14.83
25.1	1.37250	1.1052	250.6	226.8	14.89
25.2	1.37267	1.1057	251.8	227.7	14.96
25.3	1.37285	1.1062	253.0	228.7	15.04
25.4	1.37302	1.1066	254.1	229.7	15.10
25.5	1.37319	1.1071	255.3	230.6	15.17
25.6	1.37337	1.1076	256.5	231.6	15.24
25.7	1.37354	1.1080	257.7	232.5	15.32
25.8	1.37372	1.1085	258.8	233.5	15.38
25.9	1.37389	1.1090	260.0	234.5	15.45
26.0	1.37407	1.1095	261.2	235.4	15.52
26.1	1.37424	1.1099	262.4	236.4	15.59
26.2	1.37441	1.1104	263.6	237.3	15.67
26.3	1.37459	1.1109	264.7	238.3	15.73
26.4	1.37476	1.1114	265.9	239.3	15.80
26.5	1.37494	1.1118	267.1	240.2	15.87
26.6	1.37511	1.1123	268.3	241.2	15.95
26.7	1.37529	1.1128	269.5	242.1	16.02
26.8	1.37546	1.1133	270.6	243.1	16.08
26.9	1.37564	1.1138	271.8	244.1	16.15
27.0	1.37582	1.1142	273.0	245.0	16.22
27.1	1.37599	1.1147	274.2	246.0	16.30
27.2	1.37617	1.1152	275.4	246.9	16.37
27.3	1.37634	1.1157	276.6	247.9	16.44
27.4	1.37652	1.1161	277.8	248.9	16.51
27.5	1.37670	1.1166	278.9	249.8	16.58
27.6	1.37687	1.1171	280.1	250.8	16.65
27.7	1.37705	1.1176	281.3	251.7	16.72
27.8	1.37723	1.1181	282.5	252.7	16.79
27.9	1.37740	1.1185	283.7	253.6	16.86
28.0	1.37758	1.1190	284.9	254.6	16.93
28.1	1.37776	1.1195	286.1	255.5	17.00
28.2	1.37793	1.1200	287.3	256.5	17.07
28.3	1.37811	1.1205	288.5	257.5	17.15
28.4	1.37829	1.1210	289.7	258.4	17.22
28.5	1.37847	1.1214	290.9	259.4	17.29
28.6	1.37864	1.1219	292.1	260.3	17.36
28.7	1.37882	1.1224	293.3	261.3	17.43
28.8	1.37900	1.1229	294.5	262.2	17.50
28.9	1.37918	1.1234	295.7	263.2	17.57
29.0	1.37936	1.1239	296.9	264.2	17.64
29.1	1.37954	1.1244	298.1	265.1	17.72
29.2	1.37972	1.1248	299.3	266.1	17.79
29.3	1.37989	1.1253	300.5	267.0	17.86
29.4	1.38007	1.1258	301.7	268.0	17.93
29.5	1.38025	1.1263	302.9	268.9	18.00
29.6	1.38043	1.1268	304.1	269.9	18.07
29.7	1.38061	1.1273	305.3	270.8	18.14
29.8	1.38079	1.1278	306.5	271.8	18.22
29.9	1.38097	1.1283	307.7	272.7	18.29

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
30.0	1.38115	1.1287	308.9	273.7	18.36
30.1	1.38133	1.1292	310.1	274.6	18.43
30.2	1.38151	1.1297	311.3	275.6	18.50
30.3	1.38169	1.1302	312.6	276.5	18.58
30.4	1.38187	1.1307	313.8	277.5	18.65
30.5	1.38205	1.1312	315.0	278.5	18.72
30.6	1.38223	1.1317	316.2	279.4	18.79
30.7	1.38241	1.1322	317.4	280.4	18.86
30.8	1.38259	1.1327	318.6	281.3	18.93
30.9	1.38277	1.1332	319.8	282.3	19.01
31.0	1.38296	1.1337	321.1	283.2	19.08
31.1	1.38314	1.1342	322.3	284.2	19.15
31.2	1.38332	1.1346	323.5	285.1	19.23
31.3	1.38350	1.1351	324.7	286.1	19.30
31.4	1.38368	1.1356	325.9	287.0	19.37
31.5	1.38386	1.1361	327.2	288.0	19.45
31.6	1.38405	1.1366	328.4	288.9	19.52
31.7	1.38423	1.1371	329.6	289.9	19.59
31.8	1.38441	1.1376	330.8	290.8	19.66
31.9	1.38459	1.1381	332.1	291.8	19.74
32.0	1.38478	1.1386	333.3	292.7	19.81
32.1	1.38496	1.1391	334.5	293.7	19.88
32.2	1.38514	1.1396	335.7	294.6	19.95
32.3	1.38532	1.1401	337.0	295.6	20.03
32.4	1.38551	1.1406	338.2	296.5	20.10
32.5	1.38569	1.1411	339.4	297.5	20.17
32.6	1.38587	1.1416	340.7	298.4	20.25
32.7	1.38606	1.1421	341.9	299.4	20.32
32.8	1.38624	1.1426	343.1	300.3	20.39
32.9	1.38643	1.1431	344.4	301.3	20.47
33.0	1.38661	1.1436	345.6	302.2	20.54
33.1	1.38679	1.1441	346.8	303.2	20.61
33.2	1.38698	1.1446	348.1	304.1	20.69
33.3	1.38716	1.1451	349.3	305.0	20.76
33.4	1.38735	1.1456	350.6	306.0	20.84
33.5	1.38753	1.1461	351.8	306.9	20.91
33.6	1.38772	1.1466	353.0	307.9	20.98
33.7	1.38790	1.1471	354.3	308.8	21.06
33.8	1.38809	1.1476	355.5	309.8	21.13
33.9	1.38827	1.1481	356.8	310.7	21.20
34.0	1.38846	1.1486	358.0	311.7	21.28
34.1	1.38864	1.1491	359.2	312.6	21.35
34.2	1.38883	1.1496	360.5	313.6	21.42
34.3	1.38902	1.1501	361.7	314.5	21.50
34.4	1.38920	1.1507	363.0	315.5	21.57
34.5	1.38939	1.1512	364.2	316.4	21.64
34.6	1.38958	1.1517	365.5	317.4	21.72
34.7	1.38976	1.1522	366.7	318.3	21.79
34.8	1.38995	1.1527	368.0	319.2	21.87
34.9	1.39014	1.1532	369.2	320.2	21.94

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
35.0	1.39032	1.1537	370.5	321.1	22.02
35.1	1.39051	1.1542	371.8	322.1	22.10
35.2	1.39070	1.1547	373.0	323.0	22.17
35.3	1.39088	1.1552	374.3	324.0	22.24
35.4	1.39107	1.1557	375.5	324.9	22.32
35.5	1.39126	1.1563	376.8	325.9	22.39
35.6	1.39145	1.1568	378.0	326.8	22.46
35.7	1.39164	1.1573	379.3	327.8	22.54
35.8	1.39182	1.1578	380.6	328.7	22.62
35.9	1.39201	1.1583	381.8	329.6	22.69
36.0	1.39220	1.1588	383.1	330.6	22.77
36.1	1.39239	1.1593	384.4	331.5	22.84
36.2	1.39258	1.1598	385.6	332.5	22.92
36.3	1.39277	1.1603	386.9	333.4	22.99
36.4	1.39296	1.1609	388.1	334.4	23.06
36.5	1.39314	1.1614	389.4	335.3	23.14
36.6	1.39333	1.1619	390.7	336.3	23.22
36.7	1.39352	1.1624	392.0	337.2	23.30
36.8	1.39371	1.1629	393.2	338.1	23.37
36.9	1.39390	1.1634	394.5	339.1	23.45
37.0	1.39409	1.1640	395.8	340.0	23.52
37.1	1.39428	1.1645	397.0	341.0	23.59
37.2	1.39447	1.1650	398.3	341.9	23.67
37.3	1.39466	1.1655	399.6	342.9	23.75
37.4	1.39485	1.1660	400.9	343.8	23.83
37.5	1.39504	1.1665	402.1	344.7	23.90
37.6	1.39524	1.1671	403.4	345.7	23.97
37.7	1.39543	1.1676	404.7	346.6	24.05
37.8	1.39562	1.1681	406.0	347.6	24.13
37.9	1.39581	1.1686	407.3	348.5	24.21
38.0	1.39600	1.1691	408.6	349.4	24.28
38.1	1.39619	1.1697	409.8	350.4	24.35
38.2	1.39638	1.1702	411.1	351.3	24.43
38.3	1.39658	1.1707	412.4	352.3	24.51
38.4	1.39677	1.1712	413.7	353.2	24.59
38.5	1.39696	1.1717	415.0	354.2	24.66
38.6	1.39715	1.1723	416.3	355.1	24.74
38.7	1.39734	1.1728	417.6	356.0	24.82
38.8	1.39754	1.1733	418.8	357.0	24.89
38.9	1.39773	1.1738	420.1	357.9	24.97
39.0	1.39792	1.1744	421.4	358.9	25.04
39.1	1.39812	1.1749	422.7	359.8	25.12
39.2	1.39831	1.1754	424.0	360.7	25.20
39.3	1.39850	1.1759	425.3	361.7	25.28
39.4	1.39870	1.1765	426.6	362.6	25.35
39.5	1.39889	1.1770	427.9	363.6	25.43
39.6	1.39908	1.1775	429.2	364.5	25.51
39.7	1.39928	1.1780	430.5	365.4	25.58
39.8	1.39947	1.1786	431.8	366.4	25.66
39.9	1.39967	1.1791	433.1	367.3	25.74

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
40.0	1.39986	1.1796	434.4	368.3	25.82
40.1	1.40006	1.1801	435.7	369.2	25.89
40.2	1.40025	1.1807	437.0	370.1	25.97
40.3	1.40044	1.1812	438.3	371.1	26.05
40.4	1.40064	1.1817	439.6	372.0	26.13
40.5	1.40083	1.1823	440.9	373.0	26.20
40.6	1.40103	1.1828	442.2	373.9	26.28
40.7	1.40123	1.1833	443.6	374.8	26.36
40.8	1.40142	1.1839	444.9	375.8	26.44
40.9	1.40162	1.1844	446.2	376.7	26.52
41.0	1.40181	1.1849	447.5	377.7	26.59
41.1	1.40201	1.1855	448.8	378.6	26.67
41.2	1.40221	1.1860	450.1	379.5	26.75
41.3	1.40240	1.1865	451.4	380.5	26.83
41.4	1.40260	1.1871	452.8	381.4	26.91
41.5	1.40280	1.1876	454.1	382.3	26.99
41.6	1.40299	1.1881	455.4	383.3	27.06
41.7	1.40319	1.1887	456.7	384.2	27.14
41.8	1.40339	1.1892	458.0	385.2	27.22
41.9	1.40358	1.1897	459.4	386.1	27.30
42.0	1.40378	1.1903	460.7	387.0	27.38
42.1	1.40398	1.1908	462.0	388.0	27.46
42.2	1.40418	1.1913	463.3	388.9	27.53
42.3	1.40437	1.1919	464.7	389.9	27.62
42.4	1.40457	1.1924	466.0	390.8	27.69
42.5	1.40477	1.1929	467.3	391.7	27.77
42.6	1.40497	1.1935	468.6	392.7	27.85
42.7	1.40517	1.1940	470.0	393.6	27.93
42.8	1.40537	1.1946	471.3	394.5	28.01
42.9	1.40557	1.1951	472.6	395.5	28.09
43.0	1.40576	1.1956	474.0	396.4	28.17
43.1	1.40596	1.1962	475.3	397.3	28.25
43.2	1.40616	1.1967	476.6	398.3	28.32
43.3	1.40636	1.1973	478.0	399.2	28.41
43.4	1.40656	1.1978	479.3	400.2	28.48
43.5	1.40676	1.1983	480.7	401.1	28.57
43.6	1.40696	1.1989	482.0	402.0	28.65
43.7	1.40716	1.1994	483.3	403.0	28.72
43.8	1.40736	1.2000	484.7	403.9	28.81
43.9	1.40756	1.2005	486.0	404.8	28.88
44.0	1.40776	1.2011	487.4	405.8	28.97
44.1	1.40796	1.2016	488.7	406.7	29.04
44.2	1.40817	1.2022	490.1	407.6	29.13
44.3	1.40837	1.2027	491.4	408.6	29.20
44.4	1.40857	1.2032	492.8	409.5	29.29
44.5	1.40877	1.2038	494.1	410.4	29.36
44.6	1.40897	1.2043	495.5	411.4	29.45
44.7	1.40917	1.2049	496.8	412.3	29.52
44.8	1.40937	1.2054	498.2	413.3	29.61
44.9	1.40958	1.2060	499.5	414.2	29.69

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
45.0	1.40978	1.2065	500.9	415.1	29.77
45.1	1.40998	1.2071	502.2	416.1	29.85
45.2	1.41018	1.2076	503.6	417.0	29.93
45.3	1.41039	1.2082	504.9	417.9	30.01
45.4	1.41059	1.2087	506.3	418.9	30.09
45.5	1.41079	1.2093	507.7	419.8	30.17
45.6	1.41099	1.2098	509.0	420.7	30.25
45.7	1.41120	1.2104	510.4	421.7	30.33
45.8	1.41140	1.2109	511.7	422.6	30.41
45.9	1.41160	1.2115	513.1	423.5	30.49
46.0	1.41181	1.2120	514.5	424.5	30.58
46.1	1.41201	1.2126	515.8	425.4	30.65
46.2	1.41222	1.2131	517.2	426.3	30.74
46.3	1.41242	1.2137	518.6	427.3	30.82
46.4	1.41262	1.2142	519.9	428.2	30.90
46.5	1.41283	1.2148	521.3	429.1	30.98
46.6	1.41303	1.2154	522.7	430.1	31.06
46.7	1.41324	1.2159	524.1	431.0	31.15
46.8	1.41344	1.2165	525.4	431.9	31.22
46.9	1.41365	1.2170	526.8	432.9	31.31
47.0	1.41385	1.2176	528.2	433.8	31.39
47.1	1.41406	1.2181	529.6	434.7	31.47
47.2	1.41427	1.2187	530.9	435.7	31.55
47.3	1.41447	1.2192	532.3	436.6	31.63
47.4	1.41468	1.2198	533.7	437.5	31.72
47.5	1.41488	1.2204	535.1	438.5	31.80
47.6	1.41509	1.2209	536.5	439.4	31.88
47.7	1.41530	1.2215	537.9	440.3	31.97
47.8	1.41550	1.2220	539.2	441.3	32.04
47.9	1.41571	1.2226	540.6	442.2	32.13
48.0	1.41592	1.2232	542.0	443.1	32.21
48.1	1.41612	1.2237	543.4	444.1	32.29
48.2	1.41633	1.2243	544.8	445.0	32.38
48.3	1.41654	1.2248	546.2	445.9	32.46
48.4	1.41674	1.2254	547.6	446.8	32.54
48.5	1.41695	1.2260	549.0	447.8	32.63
48.6	1.41716	1.2265	550.4	448.7	32.71
48.7	1.41737	1.2271	551.8	449.6	32.79
48.8	1.41758	1.2277	553.2	450.6	32.88
48.9	1.41779	1.2282	554.6	451.5	32.96
49.0	1.41799	1.2288	556.0	452.4	33.04
49.1	1.41820	1.2294	557.4	453.4	33.13
49.2	1.41841	1.2299	558.8	454.3	33.21
49.3	1.41862	1.2305	560.2	455.2	33.29
49.4	1.41883	1.2311	561.6	456.2	33.38
49.5	1.41904	1.2316	563.0	457.1	33.46
49.6	1.41925	1.2322	564.4	458.0	33.54
49.7	1.41946	1.2328	565.8	458.9	33.63
49.8	1.41967	1.2333	567.2	459.9	33.71
49.9	1.41988	1.2339	568.6	460.8	33.79

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель преломления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
50.0	1.42009	1.2345	570.0	461.7	33.88
50.1	1.42030	1.2350	571.4	462.7	33.96
50.2	1.42051	1.2356	572.8	463.6	34.04
50.3	1.42072	1.2362	574.2	464.5	34.12
50.4	1.42093	1.2368	575.6	465.4	34.21
50.5	1.42114	1.2373	577.1	466.4	34.30
50.6	1.42135	1.2379	578.5	467.3	34.38
50.7	1.42156	1.2385	579.9	468.2	34.46
50.8	1.42177	1.2390	581.3	469.2	34.55
50.9	1.42199	1.2396	582.7	470.1	34.63
51.0	1.42220	1.2402	584.2	471.0	34.72
51.1	1.42241	1.2408	585.6	471.9	34.80
51.2	1.42262	1.2413	587.0	472.9	34.89
51.3	1.42283	1.2419	588.4	473.8	34.97
51.4	1.42305	1.2425	589.9	474.7	35.06
51.5	1.42326	1.2431	591.3	475.7	35.14
51.6	1.42347	1.2436	592.7	476.6	35.22
51.7	1.42368	1.2442	594.1	477.5	35.31
51.8	1.42390	1.2448	595.6	478.4	35.40
51.9	1.42411	1.2454	597.0	479.4	35.48
52.0	1.42432	1.2460	598.4	480.3	35.56
52.1	1.42454	1.2465	599.9	481.2	35.65
52.2	1.42475	1.2471	601.3	482.1	35.74
52.3	1.42496	1.2477	602.7	483.1	35.82
52.4	1.42518	1.2483	604.2	484.0	35.91
52.5	1.42539	1.2488	605.6	484.9	35.99
52.6	1.42561	1.2494	607.0	485.8	36.07
52.7	1.42582	1.2500	608.5	486.8	36.16
52.8	1.42604	1.2506	609.9	487.7	36.25
52.9	1.42625	1.2512	611.4	488.6	36.34
53.0	1.42647	1.2518	612.8	489.5	36.42
53.1	1.42668	1.2523	614.2	490.5	36.50
53.2	1.42690	1.2529	615.7	491.4	36.59
53.3	1.42711	1.2535	617.1	492.3	36.67
53.4	1.42733	1.2541	618.6	493.2	36.76
53.5	1.42754	1.2547	620.0	494.2	36.85
53.6	1.42776	1.2553	621.5	495.1	36.94
53.7	1.42798	1.2558	622.9	496.0	37.02
53.8	1.42819	1.2564	624.4	496.9	37.11
53.9	1.42841	1.2570	625.8	497.9	37.19
54.0	1.42863	1.2576	627.3	498.8	37.28
54.1	1.42884	1.2582	628.7	499.7	37.36
54.2	1.42906	1.2588	630.2	500.6	37.45
54.3	1.42928	1.2594	631.7	501.6	37.54
54.4	1.42949	1.2600	633.1	502.5	37.63
54.5	1.42971	1.2606	634.6	503.4	37.71
54.6	1.42993	1.2611	636.0	504.3	37.80
54.7	1.43015	1.2617	637.5	505.2	37.89
54.8	1.43036	1.2623	639.0	506.2	37.98
54.9	1.43058	1.2629	640.4	507.1	38.06

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
55.0	1.43080	1.2635	641.9	508.0	38.15
55.1	1.43102	1.2641	643.4	508.9	38.24
55.2	1.43124	1.2647	644.8	509.9	38.32
55.3	1.43146	1.2653	646.3	510.8	38.41
55.4	1.43168	1.2659	647.8	511.7	38.50
55.5	1.43189	1.2665	649.2	512.6	38.58
55.6	1.43211	1.2671	650.7	513.5	38.67
55.7	1.43233	1.2677	652.2	514.5	38.76
55.8	1.43255	1.2683	653.7	515.4	38.85
55.9	1.43277	1.2689	655.1	516.3	38.93
56.0	1.43299	1.2695	656.6	517.2	39.02
56.1	1.43321	1.2701	658.1	518.1	39.11
56.2	1.43343	1.2706	659.6	519.1	39.20
56.3	1.43365	1.2712	661.0	520.0	39.28
56.4	1.43387	1.2718	662.5	520.9	39.37
56.5	1.43410	1.2724	664.0	521.8	39.46
56.6	1.43432	1.2730	665.5	522.7	39.55
56.7	1.43454	1.2736	667.0	523.7	39.64
56.8	1.43476	1.2742	668.5	524.6	39.73
56.9	1.43498	1.2748	669.9	525.5	39.81
57.0	1.43520	1.2754	671.4	526.4	39.90
57.1	1.43542	1.2760	672.9	527.3	39.99
57.2	1.43565	1.2766	674.4	528.3	40.08
57.3	1.43587	1.2773	675.9	529.2	40.17
57.4	1.43609	1.2779	677.4	530.1	40.26
57.5	1.43631	1.2785	678.9	531.0	40.35
57.6	1.43653	1.2791	680.4	531.9	40.44
57.7	1.43676	1.2797	681.9	532.8	40.53
57.8	1.43698	1.2803	683.4	533.8	40.61
57.9	1.43720	1.2809	684.9	534.7	40.70
58.0	1.43743	1.2815	686.4	535.6	40.79
58.1	1.43765	1.2821	687.9	536.5	40.88
58.2	1.43787	1.2827	689.4	537.4	40.97
58.3	1.43810	1.2833	690.9	538.3	41.06
58.4	1.43832	1.2839	692.4	539.3	41.15
58.5	1.43855	1.2845	693.9	540.2	41.24
58.6	1.43877	1.2851	695.4	541.1	41.33
58.7	1.43899	1.2857	696.9	542.0	41.42
58.8	1.43922	1.2863	698.4	542.9	41.51
58.9	1.43944	1.2870	699.9	543.8	41.60
59.0	1.43967	1.2876	701.4	544.8	41.68
59.1	1.43989	1.2882	702.9	545.7	41.77
59.2	1.44012	1.2888	704.4	546.6	41.86
59.3	1.44035	1.2894	706.0	547.5	41.96
59.4	1.44057	1.2900	707.5	548.4	42.05
59.5	1.44080	1.2906	709.0	549.3	42.14
59.6	1.44102	1.2912	710.5	550.2	42.23
59.7	1.44125	1.2919	712.0	551.1	42.31
59.8	1.44148	1.2925	713.5	552.1	42.40
59.9	1.44170	1.2931	715.1	553.0	42.50

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
60.0	1.44193	1.2937	716.6	553.9	42.59
60.1	1.44216	1.2943	718.1	554.8	42.68
60.2	1.44238	1.2949	719.6	555.7	42.77
60.3	1.44261	1.2956	721.1	556.6	42.85
60.4	1.44284	1.2962	722.7	557.5	42.95
60.5	1.44306	1.2968	724.2	558.4	43.04
60.6	1.44329	1.2974	725.7	559.4	43.13
60.7	1.44352	1.2980	727.3	560.3	43.22
60.8	1.44375	1.2986	728.8	561.2	43.31
60.9	1.44398	1.2993	730.3	562.1	43.40
61.0	1.44420	1.2999	731.8	563.0	43.49
61.1	1.44443	1.3005	733.4	563.9	43.59
61.2	1.44466	1.3011	734.9	564.8	43.68
61.3	1.44489	1.3017	736.4	565.7	43.76
61.4	1.44512	1.3024	738.0	566.6	43.86
61.5	1.44535	1.3030	739.5	567.6	43.95
61.6	1.44558	1.3036	741.1	568.5	44.04
61.7	1.44581	1.3042	742.6	569.4	44.13
61.8	1.44604	1.3049	744.1	570.3	44.22
61.9	1.44627	1.3055	745.7	571.2	44.32
62.0	1.44650	1.3061	747.2	572.1	44.41
62.1	1.44673	1.3067	748.8	573.0	44.50
62.2	1.44696	1.3074	750.3	573.9	44.59
62.3	1.44719	1.3080	751.9	574.8	44.69
62.4	1.44742	1.3086	753.4	575.7	44.77
62.5	1.44765	1.3092	755.0	576.6	44.87
62.6	1.44788	1.3099	756.5	577.5	44.96
62.7	1.44811	1.3105	758.1	578.5	45.05
62.8	1.44834	1.3111	759.6	579.4	45.14
62.9	1.44858	1.3118	761.2	580.3	45.24
63.0	1.44881	1.3124	762.7	581.2	45.33
63.1	1.44904	1.3130	764.3	582.1	45.42
63.2	1.44927	1.3137	765.8	583.0	45.51
63.3	1.44950	1.3143	767.4	583.9	45.61
63.4	1.44974	1.3149	769.0	584.8	45.70
63.5	1.44997	1.3155	770.5	585.7	45.79
63.6	1.45020	1.3162	772.1	586.6	45.89
63.7	1.45043	1.3168	773.6	587.5	45.98
63.8	1.45067	1.3174	775.2	588.4	46.07
63.9	1.45090	1.3181	776.8	589.3	46.17
64.0	1.45113	1.3187	778.3	590.2	46.25
64.1	1.45137	1.3193	779.9	591.1	46.35
64.2	1.45160	1.3200	781.5	592.0	46.44
64.3	1.45184	1.3206	783.0	592.9	46.53
64.4	1.45207	1.3213	784.6	593.8	46.63
64.5	1.45230	1.3219	786.2	594.7	46.72
64.6	1.45254	1.3225	787.8	595.6	46.82
64.7	1.45277	1.3232	789.3	596.5	46.91
64.8	1.45301	1.3238	790.9	597.4	47.00
64.9	1.45324	1.3244	792.5	598.3	47.10

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
65.0	1.45348	1.3251	794.1	599.3	47.19
65.1	1.45371	1.3257	795.6	600.2	47.28
65.2	1.45395	1.3264	797.2	601.1	47.38
65.3	1.45418	1.3270	798.8	602.0	47.47
65.4	1.45442	1.3276	800.4	602.9	47.57
65.5	1.45466	1.3283	802.0	603.8	47.66
65.6	1.45489	1.3289	803.6	604.7	47.76
65.7	1.45513	1.3296	805.1	605.6	47.85
65.8	1.45537	1.3302	806.7	606.5	47.94
65.9	1.45560	1.3309	808.3	607.4	48.04
66.0	1.45584	1.3315	809.9	608.3	48.13
66.1	1.45608	1.3322	811.5	609.2	48.23
66.2	1.45631	1.3328	813.1	610.1	48.32
66.3	1.45655	1.3334	814.7	611.0	48.42
66.4	1.45679	1.3341	816.3	611.9	48.51
66.5	1.45703	1.3347	817.9	612.8	48.61
66.6	1.45726	1.3354	819.5	613.7	48.70
66.7	1.45750	1.3360	821.1	614.6	48.80
66.8	1.45774	1.3367	822.7	615.5	48.89
66.9	1.45798	1.3373	824.3	616.3	48.99
67.0	1.45822	1.3380	825.9	617.2	49.08
67.1	1.45846	1.3386	827.5	618.1	49.18
67.2	1.45870	1.3393	829.1	619.0	49.27
67.3	1.45893	1.3399	830.7	619.9	49.37
67.4	1.45917	1.3406	832.3	620.8	49.46
67.5	1.45941	1.3412	833.9	621.7	49.56
67.6	1.45965	1.3419	835.5	622.6	49.65
67.7	1.45989	1.3425	837.1	623.5	49.75
67.8	1.46013	1.3432	838.7	624.4	49.84
67.9	1.46037	1.3438	840.3	625.3	49.94
68.0	1.46061	1.3445	841.9	626.2	50.03
68.1	1.46085	1.3451	843.6	627.1	50.14
68.2	1.46109	1.3458	845.2	628.0	50.23
68.3	1.46134	1.3464	846.8	628.9	50.33
68.4	1.46158	1.3471	848.4	629.8	50.42
68.5	1.46182	1.3478	850.0	630.7	50.52
68.6	1.46206	1.3484	851.6	631.6	50.61
68.7	1.46230	1.3491	853.3	632.5	50.71
68.8	1.46254	1.3497	854.9	633.4	50.81
68.9	1.46278	1.3504	856.5	634.3	50.90
69.0	1.46303	1.3510	858.1	635.2	51.00
69.1	1.46327	1.3517	859.8	636.1	51.10
69.2	1.46351	1.3524	861.4	636.9	51.19
69.3	1.46375	1.3530	863.0	637.8	51.29
69.4	1.46400	1.3537	864.7	638.7	51.39
69.5	1.46424	1.3543	866.3	639.6	51.48
69.6	1.46448	1.3550	867.9	640.5	51.58
69.7	1.46473	1.3557	869.5	641.4	51.67
69.8	1.46497	1.3563	871.2	642.3	51.78
69.9	1.46521	1.3570	872.8	643.2	51.87

ТАБЛИЦА II - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
70.0	1.46546	1.3576	874.5	644.1	51.97
70.1	1.46570	1.3583	876.1	645.0	52.07
70.2	1.46594	1.3590	877.7	645.9	52.16
70.3	1.46619	1.3596	879.4	646.8	52.26
70.4	1.46643	1.3603	881.0	647.7	52.36
70.5	1.46668	1.3610	882.7	648.5	52.46
70.6	1.46692	1.3616	884.3	649.4	52.55
70.7	1.46717	1.3623	886.0	650.3	52.65
70.8	1.46741	1.3630	887.6	651.2	52.75
70.9	1.46766	1.3636	889.3	652.1	52.85
71.0	1.46790	1.3643	890.9	653.0	52.95
71.1	1.46815	1.3650	892.6	653.9	53.05
71.2	1.46840	1.3656	894.2	654.8	53.14
71.3	1.46864	1.3663	895.9	655.7	53.24
71.4	1.46889	1.3670	897.5	656.6	53.34
71.5	1.46913	1.3676	899.2	657.5	53.44
71.6	1.46938	1.3683	900.8	658.3	53.53
71.7	1.46963	1.3690	902.5	659.2	53.64
71.8	1.46987	1.3696	904.1	660.1	53.73
71.9	1.47012	1.3703	905.8	661.0	53.83
72.0	1.47037	1.3710	907.5	661.9	53.93
72.1	1.47062	1.3717	909.1	662.8	54.03
72.2	1.47086	1.3723	910.8	663.7	54.13
72.3	1.47111	1.3730	912.5	664.6	54.23
72.4	1.47136	1.3737	914.1	665.5	54.32
72.5	1.47161	1.3743	915.8	666.3	54.43
72.6	1.47186	1.3750	917.5	667.2	54.53
72.7	1.47210	1.3757	919.1	668.1	54.62
72.8	1.47235	1.3764	920.8	669.0	54.72
72.9	1.47260	1.3770	922.5	669.9	54.82
73.0	1.47285	1.3777	924.2	670.8	54.93
73.1	1.47310	1.3784	925.8	671.7	55.02
73.2	1.47335	1.3791	927.5	672.6	55.12
73.3	1.47360	1.3797	929.2	673.5	55.22
73.4	1.47385	1.3804	930.9	674.3	55.32
73.5	1.47410	1.3811	932.6	675.2	55.42
73.6	1.47435	1.3818	934.3	676.1	55.53
73.7	1.47460	1.3825	935.9	677.0	55.62
73.8	1.47485	1.3831	937.6	677.9	55.72
73.9	1.47510	1.3838	939.3	678.8	55.82
74.0	1.47535	1.3845	941.0	679.7	55.92
74.1	1.47560	1.3852	942.7	680.6	56.02
74.2	1.47585	1.3859	944.4	681.4	56.13
74.3	1.47610	1.3865	946.1	682.3	56.23
74.4	1.47635	1.3872	947.8	683.2	56.33
74.5	1.47661	1.3879	949.5	684.1	56.43
74.6	1.47686	1.3886	951.2	685.0	56.53
74.7	1.47711	1.3893	952.9	685.9	56.63
74.8	1.47736	1.3899	954.6	686.8	56.73
74.9	1.47761	1.3906	956.3	687.7	56.83

ТАБЛИЦА III

В таблице представлена концентрация сахара в ректифицированных концентрированных суслах в граммах на литр и граммах на килограмм, определяемая с помощью рефрактометра, градуированного либо в процентах по массе сахарозы при 20°C, либо в показателе преломления при 20°C.

ТАБЛИЦА III

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахар ав г/кг	Крепость % об. при 20 °C
50.0	1.42008	1.2342	627.6	508.5	37.30
50.1	1.42029	1.2348	629.3	509.6	37.40
50.2	1.42050	1.2355	630.9	510.6	37.49
50.3	1.42071	1.2362	632.4	511.6	37.58
50.4	1.42092	1.2367	634.1	512.7	37.68
50.5	1.42113	1.2374	635.7	513.7	37.78
50.6	1.42135	1.2381	637.3	514.7	37.87
50.7	1.42156	1.2386	638.7	515.7	37.96
50.8	1.42177	1.2391	640.4	516.8	38.06
50.9	1.42198	1.2396	641.9	517.8	38.15
51.0	1.42219	1.2401	643.4	518.8	38.24
51.1	1.42240	1.2406	645.0	519.9	38.33
51.2	1.42261	1.2411	646.5	520.9	38.42
51.3	1.42282	1.2416	648.1	522.0	38.52
51.4	1.42304	1.2421	649.6	523.0	38.61
51.5	1.42325	1.2427	651.2	524.0	38.70
51.6	1.42347	1.2434	652.9	525.1	38.80
51.7	1.42368	1.2441	654.5	526.1	38.90
51.8	1.42389	1.2447	656.1	527.1	38.99
51.9	1.42410	1.2454	657.8	528.2	39.09
52.0	1.42432	1.2461	659.4	529.2	39.19
52.1	1.42453	1.2466	661.0	530.2	39.28
52.2	1.42475	1.2470	662.5	531.3	39.37
52.3	1.42496	1.2475	664.1	532.3	39.47
52.4	1.42517	1.2480	665.6	533.3	39.56
52.5	1.42538	1.2486	667.2	534.4	39.65
52.6	1.42560	1.2493	668.9	535.4	39.75
52.7	1.42581	1.2500	670.5	536.4	39.85
52.8	1.42603	1.2506	672.2	537.5	39.95
52.9	1.42624	1.2513	673.8	538.5	40.04
53.0	1.42645	1.2520	675.5	539.5	40.14
53.1	1.42667	1.2525	677.1	540.6	40.24
53.2	1.42689	1.2530	678.5	541.5	40.32
53.3	1.42711	1.2535	680.2	542.6	40.42
53.4	1.42733	1.2540	681.8	543.7	40.52
53.5	1.42754	1.2546	683.4	544.7	40.61
53.6	1.42776	1.2553	685.1	545.8	40.72
53.7	1.42797	1.2560	686.7	546.7	40.81
53.8	1.42819	1.2566	688.4	547.8	40.91
53.9	1.42840	1.2573	690.1	548.9	41.01
54.0	1.42861	1.2580	691.7	549.8	41.11
54.1	1.42884	1.2585	693.3	550.9	41.20
54.2	1.42906	1.2590	694.9	551.9	41.30
54.3	1.42927	1.2595	696.5	553.0	41.39
54.4	1.42949	1.2600	698.1	554.0	41.49
54.5	1.42971	1.2606	699.7	555.1	41.58
54.6	1.42993	1.2613	701.4	556.1	41.68
54.7	1.43014	1.2620	703.1	557.1	41.79
54.8	1.43036	1.2625	704.7	558.2	41.88
54.9	1.43058	1.2630	706.2	559.1	41.97

ТАБЛИЦА III - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
55.0	1.43079	1.2635	707.8	560.2	42.06
55.1	1.43102	1.2639	709.4	561.3	42.16
55.2	1.43124	1.2645	711.0	562.3	42.25
55.3	1.43146	1.2652	712.7	563.3	42.36
55.4	1.43168	1.2659	714.4	564.3	42.46
55.5	1.43189	1.2665	716.1	565.4	42.56
55.6	1.43211	1.2672	717.8	566.4	42.66
55.7	1.43233	1.2679	719.5	567.5	42.76
55.8	1.43255	1.2685	721.1	568.5	42.85
55.9	1.43277	1.2692	722.8	569.5	42.96
56.0	1.43298	1.2699	724.5	570.5	43.06
56.1	1.43321	1.2703	726.1	571.6	43.15
56.2	1.43343	1.2708	727.7	572.6	43.25
56.3	1.43365	1.2713	729.3	573.7	43.34
56.4	1.43387	1.2718	730.9	574.7	43.44
56.5	1.43409	1.2724	732.6	575.8	43.54
56.6	1.43431	1.2731	734.3	576.8	43.64
56.7	1.43454	1.2738	736.0	577.8	43.74
56.8	1.43476	1.2744	737.6	578.8	43.84
56.9	1.43498	1.2751	739.4	579.9	43.94
57.0	1.43519	1.2758	741.1	580.9	44.04
57.1	1.43542	1.2763	742.8	582.0	44.14
57.2	1.43564	1.2768	744.4	583.0	44.24
57.3	1.43586	1.2773	745.9	584.0	44.33
57.4	1.43609	1.2778	747.6	585.1	44.43
57.5	1.43631	1.2784	749.3	586.1	44.53
57.6	1.43653	1.2791	751.0	587.1	44.63
57.7	1.43675	1.2798	752.7	588.1	44.73
57.8	1.43698	1.2804	754.4	589.2	44.83
57.9	1.43720	1.2810	756.1	590.2	44.94
58.0	1.43741	1.2818	757.8	591.2	45.04
58.1	1.43764	1.2822	759.5	592.3	45.14
58.2	1.43784	1.2827	761.1	593.4	45.23
58.3	1.43909	1.2832	762.6	594.3	45.32
58.4	1.43832	1.2837	764.3	595.4	45.42
58.5	1.43854	1.2843	766.0	596.4	45.52
58.6	1.43877	1.2850	767.8	597.5	45.63
58.7	1.43899	1.2857	769.5	598.5	45.73
58.8	1.43922	1.2863	771.1	599.5	45.83
58.9	1.43944	1.2869	772.9	600.6	45.93
59.0	1.43966	1.2876	774.6	601.6	46.03
59.1	1.43988	1.2882	776.3	602.6	46.14
59.2	1.44011	1.2889	778.1	603.7	46.24
59.3	1.44034	1.2896	779.8	604.7	46.34
59.4	1.44057	1.2902	781.6	605.8	46.45
59.5	1.44079	1.2909	783.3	606.8	46.55
59.6	1.44102	1.2916	785.2	607.9	46.66
59.7	1.44124	1.2921	786.8	608.9	46.76
59.8	1.44147	1.2926	788.4	609.9	46.85
59.9	1.44169	1.2931	790.0	610.9	46.95

ТАБЛИЦА III - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
60.0	1.44192	1.2936	791.7	612.0	47.05
60.1	1.44215	1.2942	793.3	613.0	47.15
60.2	1.44238	1.2949	795.2	614.1	47.26
60.3	1.44260	1.2956	796.9	615.1	47.36
60.4	1.44283	1.2962	798.6	616.1	47.46
60.5	1.44305	1.2969	800.5	617.2	47.57
60.6	1.44328	1.2976	802.2	618.2	47.67
60.7	1.44351	1.2981	803.9	619.3	47.78
60.8	1.44374	1.2986	805.5	620.3	47.87
60.9	1.44397	1.2991	807.1	621.3	47.97
61.0	1.44419	1.2996	808.7	622.3	48.06
61.1	1.44442	1.3002	810.5	623.4	48.17
61.2	1.44465	1.3009	812.3	624.4	48.27
61.3	1.44488	1.3016	814.2	625.5	48.39
61.4	1.44511	1.3022	815.8	626.5	48.48
61.5	1.44534	1.3029	817.7	627.6	48.60
61.6	1.44557	1.3036	819.4	628.6	48.70
61.7	1.44580	1.3042	821.3	629.7	48.81
61.8	1.44603	1.3049	823.0	630.7	48.91
61.9	1.44626	1.3056	824.8	631.7	49.02
62.0	1.44648	1.3062	826.6	632.8	49.12
62.1	1.44672	1.3068	828.3	633.8	49.23
62.2	1.44695	1.3075	830.0	634.8	49.33
62.3	1.44718	1.3080	831.8	635.9	49.43
62.4	1.44741	1.3085	833.4	636.9	49.53
62.5	1.44764	1.3090	835.1	638.0	49.63
62.6	1.44787	1.3095	836.8	639.0	49.73
62.7	1.44810	1.3101	838.5	640.0	49.83
62.8	1.44833	1.3108	840.2	641.0	49.93
62.9	1.44856	1.3115	842.1	642.1	50.05
63.0	1.44879	1.3121	843.8	643.1	50.15
63.1	1.44902	1.3128	845.7	644.2	50.26
63.2	1.44926	1.3135	847.5	645.2	50.37
63.3	1.44949	1.3141	849.3	646.3	50.47
63.4	1.44972	1.3148	851.1	647.3	50.58
63.5	1.44995	1.3155	853.0	648.4	50.69
63.6	1.45019	1.3161	854.7	649.4	50.79
63.7	1.45042	1.3168	856.5	650.4	50.90
63.8	1.45065	1.3175	858.4	651.5	51.01
63.9	1.45088	1.3180	860.0	652.5	51.11
64.0	1.45112	1.3185	861.6	653.5	51.20
64.1	1.45135	1.3190	863.4	654.6	51.31
64.2	1.45158	1.3195	865.1	655.6	51.41
64.3	1.45181	1.3201	866.9	656.7	51.52
64.4	1.45205	1.3208	868.7	657.7	51.63
64.5	1.45228	1.3215	870.6	658.8	51.74
64.6	1.45252	1.3221	872.3	659.8	51.84
64.7	1.45275	1.3228	874.1	660.8	51.95
64.8	1.45299	1.3235	876.0	661.9	52.06
64.9	1.45322	1.3241	877.8	662.9	52.17

ТАБЛИЦА III - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
65.0	1.45347	1.3248	879.7	664.0	52.28
65.1	1.45369	1.3255	881.5	665.0	52.39
65.2	1.45393	1.3261	883.2	666.0	52.49
65.3	1.45416	1.3268	885.0	667.0	52.60
65.4	1.45440	1.3275	886.9	668.1	52.71
65.5	1.45463	1.3281	888.8	669.2	52.82
65.6	1.45487	1.3288	890.6	670.2	52.93
65.7	1.45510	1.3295	892.4	671.2	53.04
65.8	1.45534	1.3301	894.2	672.3	53.14
65.9	1.45557	1.3308	896.0	673.3	53.25
66.0	1.45583	1.3315	898.0	674.4	53.37
66.1	1.45605	1.3320	899.6	675.4	53.46
66.2	1.45629	1.3325	901.3	676.4	53.56
66.3	1.45652	1.3330	903.1	677.5	53.67
66.4	1.45676	1.3335	904.8	678.5	53.77
66.5	1.45700	1.3341	906.7	679.6	53.89
66.6	1.45724	1.3348	908.5	680.6	53.99
66.7	1.45747	1.3355	910.4	681.7	54.11
66.8	1.45771	1.3361	912.2	682.7	54.21
66.9	1.45795	1.3367	913.9	683.7	54.31
67.0	1.45820	1.3374	915.9	684.8	54.43
67.1	1.45843	1.3380	917.6	685.8	54.53
67.2	1.45867	1.3387	919.6	686.9	54.65
67.3	1.45890	1.3395	921.4	687.9	54.76
67.4	1.45914	1.3400	923.1	688.9	54.86
67.5	1.45938	1.3407	925.1	690.0	54.98
67.6	1.45962	1.3415	927.0	691.0	55.09
67.7	1.45986	1.3420	928.8	692.1	55.20
67.8	1.46010	1.3427	930.6	693.1	55.31
67.9	1.46034	1.3434	932.6	694.2	55.42
68.0	1.46060	1.3440	934.4	695.2	55.53
68.1	1.46082	1.3447	936.2	696.2	55.64
68.2	1.46106	1.3454	938.0	697.2	55.75
68.3	1.46130	1.3460	939.9	698.3	55.86
68.4	1.46154	1.3466	941.8	699.4	55.97
68.5	1.46178	1.3473	943.7	700.4	56.08
68.6	1.46202	1.3479	945.4	701.4	56.19
68.7	1.46226	1.3486	947.4	702.5	56.30
68.8	1.46251	1.3493	949.2	703.5	56.41
68.9	1.46275	1.3499	951.1	704.6	56.52
69.0	1.46301	1.3506	953.0	705.6	56.64
69.1	1.46323	1.3513	954.8	706.6	56.74
69.2	1.46347	1.3519	956.7	707.7	56.86
69.3	1.46371	1.3526	958.6	708.7	56.97
69.4	1.46396	1.3533	960.6	709.8	57.09
69.5	1.46420	1.3539	962.4	710.8	57.20
69.6	1.46444	1.3546	964.3	711.9	57.31
69.7	1.46468	1.3553	966.2	712.9	57.42
69.8	1.46493	1.3560	968.2	714.0	57.54
69.9	1.46517	1.3566	970.0	715.0	57.65

ТАБЛИЦА III - (продолжение)

Сахароза % (м/м)	Показатель прелом-ления при 20 °C	Плотность массы при 20 °C	Сахара в г/л	Сахара в г/кг	Крепость % об. при 20 °C
70.0	1.46544	1.3573	971.8	716.0	57.75
70.1	1.46565	1.3579	973.8	717.1	57.87
70.2	1.46590	1.3586	975.6	718.1	57.98
70.3	1.46614	1.3593	977.6	719.2	58.10
70.4	1.46639	1.3599	979.4	720.2	58.21
70.5	1.46663	1.3606	981.3	721.2	58.32
70.6	1.46688	1.3613	983.3	722.3	58.44
70.7	1.46712	1.3619	985.2	723.4	58.55
70.8	1.46737	1.3626	987.1	724.4	58.66
70.9	1.46761	1.3633	988.9	725.4	58.77
71.0	1.46789	1.3639	990.9	726.5	58.89
71.1	1.46810	1.3646	992.8	727.5	59.00
71.2	1.46835	1.3653	994.8	728.6	59.12
71.3	1.46859	1.3659	996.6	729.6	59.23
71.4	1.46884	1.3665	998.5	730.7	59.34
71.5	1.46908	1.3672	1000.4	731.7	59.45
71.6	1.46933	1.3678	1002.2	732.7	59.56
71.7	1.46957	1.3685	1004.2	733.8	59.68
71.8	1.46982	1.3692	1006.1	734.8	59.79
71.9	1.47007	1.3698	1008.0	735.9	59.91
72.0	1.47036	1.3705	1009.9	736.9	60.02
72.1	1.47056	1.3712	1012.0	738.0	60.14
72.2	1.47081	1.3718	1013.8	739.0	60.25
72.3	1.47106	1.3725	1015.7	740.0	60.36
72.4	1.47131	1.3732	1017.7	741.1	60.48
72.5	1.47155	1.3738	1019.5	742.1	60.59
72.6	1.47180	1.3745	1021.5	743.2	60.71
72.7	1.47205	1.3752	1023.4	744.2	60.82
72.8	1.47230	1.3758	1025.4	745.3	60.94
72.9	1.47254	1.3765	1027.3	746.3	61.05
73.0	1.47284	1.3772	1029.3	747.4	61.17
73.1	1.47304	1.3778	1031.2	748.4	61.28
73.2	1.47329	1.3785	1033.2	749.5	61.40
73.3	1.47354	1.3792	1035.1	750.5	61.52
73.4	1.47379	1.3798	1037.1	751.6	61.63
73.5	1.47404	1.3805	1039.0	752.6	61.75
73.6	1.47429	1.3812	1040.9	753.6	61.86
73.7	1.47454	1.3818	1042.8	754.7	61.97
73.8	1.47479	1.3825	1044.8	755.7	62.09
73.9	1.47504	1.3832	1046.8	756.8	62.21
74.0	1.47534	1.3838	1048.6	757.8	62.32
74.1	1.47554	1.3845	1050.7	758.9	62.44
74.2	1.47579	1.3852	1052.6	759.9	62.56
74.3	1.47604	1.3858	1054.6	761.0	62.67
74.4	1.47629	1.3865	1056.5	762.0	62.79
74.5	1.47654	1.3871	1058.5	763.1	62.91
74.6	1.47679	1.3878	1060.4	764.1	63.02
74.7	1.47704	1.3885	1062.3	765.1	63.13
74.8	1.47730	1.3892	1064.4	766.2	63.26
74.9	1.47755	1.3898	1066.3	767.2	63.37
75.0	1.47785	1.3905	1068.3	768.3	63.49

Метод OIV-MA-AS2-03A Метод I типа

Общее сухое вещество

(Резолюция Oeno 377/2009 and 387/2009)
(С правками резолюции Oeno 465/2012)

1 Определение метода

Общий сухой экстракт или общее сухое вещество включает все вещества, которые являются нелетучими при определенных физических условиях. Эти физические условия должны быть такими, чтобы вещество, образующее экстракт, претерпевало как можно меньше изменений во время проведения испытания.

Экстракт без сахара представляет собой разницу между общим сухим экстрактом и общим содержанием сахаров. Приведённый экстракт представляет собой разницу между общим сухим экстрактом и общим содержанием сахаров, превышающим 1 г/л, сульфатом калия, превышающим 1 г/л, любым присутствующим маннитом и любыми другими химическими веществами, которые могли быть добавлены в вино.

Остаточный экстракт представляет собой экстракт без сахара за вычетом фиксированной кислотности, выраженной в виде винной кислоты.

2 Сущность метода

Масса остатка, полученного при высушивании пробы вина, предварительно абсорбированной на фильтровальной бумаге, в потоке воздуха при давлении 20 - 25 мм Hg при 70°C.

2 Метод работы

3.1 *Используемое оборудование*

3.1.1 Печь:

Цилиндрическая чаша (внутренний диаметр: 27 см, высота: 6 см) из алюминия с алюминиевой крышкой, нагревается до 70°C и регулируется до 1°C.

Трубка (внутренний диаметр: 25 мм), соединяющая печь с вакуумным насосом, обеспечивающим скорость потока 50 л/ч. Воздух, предварительно высушенный путем барботажа через концентрированную серную кислоту, циркулирует в печи с помощью вентилятора, чтобы добиться быстрого однородного повторного нагрева. Скорость потока воздуха регулируется краном и должна составлять 30-40 л в час, а давление в духовке 25 мм рт.

После этого печь можно использовать при условии, что она откалибрована в соответствии с 3.1.3.

3.1.2 Посуда:

Посуда из нержавеющей стали (внутренний диаметр 60 мм, высота 25 мм) снабжена закрывающимися крышками. Каждая чашка содержит 4-4.5 г фильтровальной бумаги, нарезанной на рифленые полоски длиной 22 мм.

Фильтровальную бумагу сначала промывают соляной кислотой, 2 г/л, в течение 8 ч, пять раз ополаскивают водой и затем сушат на воздухе.

3.1.3 Калибровка прибора и метода

a) Проверка герметичности крышек посуды. Чашка, оставленная в лаборатории, с высушенной фильтровальной бумагой с закрытой крышкой после предварительного охлаждения в эксикаторе с серной кислотой не должна набирать более 1 мг/ч.

b) Проверка степени сушки. Чистый раствор сахарозы 100 г/л должен давать сухой экстракт 100 г. ± 1 г/л.

c) Чистый раствор молочной кислоты, 10 г/л, должен давать сухой экстракт не менее 9,5 г/л.

При необходимости время сушки в печи можно увеличить или уменьшить, изменив скорость подачи воздуха в печь или изменив давление, чтобы эти условия были соблюдены.

ПРИМЕЧАНИЕ. Раствор молочной кислоты можно приготовить следующим образом: 10 мл молочной кислоты разбавляют водой примерно до 100 мл. Раствор помещают в посуду и нагревают на кипящей водяной бане в течение 4 ч, добавляют дистиллированную воду, если объем уменьшается до менее 50 мл (примерно). Следует довести раствор до 1 л и титровать 10 мл этого раствора 0.1 М щелочью. Раствор молочной кислоты следует довести до 10 г/л.

3.2 *Проведение исследования*

3.2.1 Взвешивание посуды

Помещают блюдо с фильтровальной бумагой в духовку на 1 час. Выключают вакуумный насос и сразу же накрывают посуду крышкой при открытии духовки. Остужают в эксикаторе и взвешивают с точностью до 0,1 мг: масса чашки и крышки составляет p_O g.

3.2.2 Взвешивание образца

Помещают 10 мл сусла или вина в чашу для взвешивания. Дают образцу полностью впитаться в фильтровальную бумагу. Помещают блюдо в печь на 2 ч (или на время, используемое при калибровке стандарта в 3.1.3). Взвешивают чашку, следуя процедуре 3.2.1, начиная с «Остановить вакуум…». Масса равна *p* g.

Примечание: при анализе очень сладких вин или сусел следует брать массу пробы.

3.3 *Расчет*

Суммарный сухой экстракт определяется как:

$$(p - p_0) \times 100$$

Для очень сладких вин или сусел общий сухой экстракт определяется как:

$$(p - p_0) \times \frac{\rho_{20}}{P} \times 1000$$

P = масса образца в граммах

ρ_{20} = плотность вина или сусла в г/мл.

3.4 *Выражение результатов*

Общий сухой экстракт выражается в г/л с точностью до одного десятичного знака.

Примечание:

Рассчивают общий сухой экстракт, отдельно учитывая количества глюкозы и фруктозы (редуцирующий сахар) и количество сахарозы, как показано ниже:

Экстракт без сахара = Общий сухой экстракт - редуцирующий сахар (глюкоза + фруктоза) - сахароза

В случае, если метод анализа допускает инверсию сахара, используйте следующую формулу для расчета:

Экстракт без сахара = Общий сухой экстракт - редуцирующий сахар (глюкоза + фруктоза) - [(Сахар после инверсии - Сахар до инверсии) x 0,95]

Инверсия относится к процессу, который приводит к превращению стереоизомера в соединения с обратной стереоизомерией. В частности, процесс, основанный на расщеплении сахарозы на фруктозу и глюкозу, осуществляют путем выдерживания подкисленных растворов, содержащих сахар (100 мл раствора, содержащего сахар + 5 мл концентрированной соляной кислоты) не менее 15 мин при температуре 50°C или выше на водяной бане (водяная баня поддерживается при температуре 60°C до тех пор, пока температура раствора не достигнет 50°C), называется *инверсией сахара*. Конечный раствор является левовращающим из-за присутствия фруктозы, тогда как исходный раствор является правовращающим из-за присутствия сахарозы.

ТАБЛИЦА I
Для расчета общего содержания сухого экстракта (г/л)

Плотность до 2 десятичных	3-й десятичный разряд									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Экстракт г/л									
1.00	0	2.6	5.1	7.7	10.3	12.9	15.4	18.0	20.6	23.2
1.01	25.8	28.4	31.0	33.6	36.2	38.8	41.3	43.9	46.5	49.1
1.02	51.7	54.3	56.9	59.5	62.1	64.7	67.3	69.9	72.5	75.1
1.03	77.7	80.3	82.9	85.5	88.1	90.7	93.3	95.9	98.5	101.1
1.04	103.7	106.3	109.0	111.6	114.2	116.8	119.4	122.0	124.6	127.2
1.05	129.8	132.4	135.0	137.6	140.3	142.9	145.5	148.1	150.7	153.3
1.06	155.9	158.6	161.2	163.8	166.4	169.0	171.6	174.3	176.9	179.5
1.07	182.1	184.8	.187.4	190.0	192.6	195.2	197.8	200.5	203.1	205.8
1.08	208.4	211.0	213.6	216.2	218.9	221.5	224.1	226.8	229.4	232.0
1.09	234.7	237.3	239.9	242.5	245.2	247.8	250.4	253.1	255.7	258.4
1.10	261.0	263.6	266.3	268.9	271.5	274.2	276.8	279.5	282.1	284.8
1.11	287.4	290.0	292.7	295.3	298.0	300.6	303.3	305.9	308.6	311.2
1.12	313.9	316.5	319.2	321.8	324.5	327.1	329.8	332.4	335.1	337.8
1.13	340.4	343.0	345.7	348.3	351.0	353.7	356.3	359.0	361.6	364.3
1.14	366.9	369.6	372.3	375.0	377.6	380.3	382.9	385.6	388.3	390.9
1.15	393.6	396.2	398.9	401.6	404.3	406.9	409.6	412.3	415.0	417.6
1.16	420.3	423.0	425.7	428.3	431.0	433.7	436.4	439.0	441.7	444.4
1.17	447.1	449.8	452.4	455.2	457.8	460.5	463.2	465.9	468.6	471.3
1.18	473.9	476.6	479.3	482.0	484.7	487.4	490.1	492.8	495.5	498.2
1.19	500.9	503.5	506.2	508.9	511.6	514.3	517.0	519.7	522.4	525.1
1.20	527.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ТАБЛИЦА ИНТЕРПОЛЯЦИИ

4-й десятичный разряд	Экстракт г/л	4-й десятичный разряд	Экстракт г/л	4-й десятичный разряд	Экстракт г/л
1	0.3	4	1.0	7	1.8
2	0.5	5	1.3	8	2.1
3	0.8	6	1.6	9	2.3

БИБЛИОГРАФИЯ

PIEN J., MEINRATH H., *Ann. Fals. Fraudes,* 1938, **30,** 282.
DUPAIGNE P., *Bull. Inst. Jus Fruits,* 1947, No 4.
TAVERNIER J., JACQUIN P., *Ind. Agric. Alim.,* 1947, **64,** 379.
JAULMES P., HAMELLE Mlle G., *Bull. O.I.V.,* 1954, **27,** 276.
JAULMES P., HAMELLE Mlle G., *Mise au point de chimie analytique pure et appliquée, et d'analyse bromatologique,* 1956, par J.A. GAUTIER, Paris, 4e série.
JAULMES P., HAMELLE Mlle G., *Trav. Soc. Pharm. Montpellier,* 1963, 243.
HAMELLE Mlle G., *Extrait sec des vins et des moûts de raisin,* 1965, Thèse Doct. Pharm. Montpellier.

Метод OIV-MA-AS2-03B Метод IV типа

Общее сухое вещество

(Резолюция Oeno 377/2009 and 387/2009)
(С правками резолюции Oeno 465/2012)

1 Определение метода

Общий сухой экстракт или общее сухое вещество включает все вещества, которые являются нелетучими при определенных физических условиях. Эти физические условия должны быть такими, чтобы вещество, образующее экстракт, претерпевало как можно меньше изменений во время проведения испытания.

Экстракт без сахара представляет собой разницу между общим сухим экстрактом и общим содержанием сахара. Приведённый экстракт представляет собой разницу между общим сухим экстрактом и общим содержанием сахара, превышающим 1 г/л, сульфатом калия, превышающим 1 г/л, любым присутствующим маннитом и любыми другими химическими веществами, которые могли быть добавлены в вино.

Остаточный экстракт представляет собой экстракт без сахара за вычетом фиксированной кислотности, выраженной в виде винной кислоты.

2 Сущность метода

Общий сухой экстракт рассчитывается косвенно по удельному весу сусла, а для вина - по удельному весу безалкогольного вина.

Сухой экстракт выражается количеством сахарозы, которая при растворении в воде и доведении до объема в один литр дает раствор той же плотности, что и сусло или безалкогольное вино.

3 Метод работы

3.1 *Проведение исследования*

Определите удельный вес сусла или вина.

В случае вина рассчитайте удельный вес «безалкогольного вина» по следующей формуле:

$$d_r = d_v - d_a + 1.000$$

где:
d_v = удельный вес вина при 20°C (с поправкой на летучую кислотность [1])
d_a = удельный вес при 20°C водно-спиртовой смеси той же крепости, что и вино, полученное по формуле:

$$d_r = 1.00180^{**} (r_v - r_a) + 1.000$$

где :
r_v = плотность вина при 20°C (с поправкой на летучую кислотность 1 [1])
r_a = плотность при 20°C водно-спиртовой смеси той же крепости, что и вино, полученное из таблицы 1 главы *Крепость спирта по объему* для температуры 20°C.

3.2 *Расчет*
Используют значение удельного веса безалкогольного вина, чтобы получить общий сухой экстракт (г/л) из таблицы I.

3.3 *Выражение результатов*
Общий сухой экстракт указывается в г/л с точностью до одного десятичного знака.

Примечание:
Рассчитывают общий сухой экстракт, отдельно учитывая количества глюкозы и фруктозы (редуцирующий сахар) и количество сахарозы, как показано ниже:

Экстракт без сахара = Общий сухой экстракт - редуцирующий сахар (глюкоза + фруктоза) - сахароза

В случае, если метод анализа допускает инверсию сахара, используют следующую формулу для расчета:

---

[1] ПРИМЕЧАНИЕ: Перед выполнением этого расчета удельный вес (или плотность) вина, измеренный, как указано выше, следует скорректировать с учетом влияния летучей кислотности по формуле:

$$d_v = d_{20}^{20} \quad 0.0000086a \qquad \text{or} \qquad \rho_v = \rho_{20} - 0.0000086a$$

где a — летучая кислотность, выраженная в миллиэквивалентах на литр.

** Коэффициент 1.0018 приближается к 1, когда r_v ниже 1.05, что часто бывает.

Экстракт без сахара = Общий сухой экстракт - редуцирующий сахар (глюкоза + фруктоза) - [(сахар после инверсии - сахар до инверсии) x 0,95]

Инверсия относится к процессу, который приводит к превращению стереоизомера в соединения с обратной стереоизомерией. В частности, процесс, основанный на расщеплении сахарозы на фруктозу и глюкозу, осуществляют путем выдерживания подкисленных растворов, содержащих сахар (100 мл раствора, содержащего сахара + 5 мл концентрированной соляной кислоты) не менее 15 мин при температуре 50°C и выше на водяной бане (водяная баня поддерживается при температуре 60°C до тех пор, пока температура раствора не достигнет 50°C), называется *инверсией сахара*. Конечный раствор является левовращающим из-за присутствия фруктозы, тогда как исходный раствор является правовращающим из-за присутствия сахарозы.

ТАБЛИЦА I
Для расчета общего содержания сухого экстракта (г/л)

Плотность до 2 знаков после запятой	3-й десятичный разряд									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Экстракт г/л									
1.00	0	2.6	5.1	7.7	10.3	12.9	15.4	18.0	20.6	23.2
1.01	25.8	28.4	31.0	33.6	36.2	38.8	41.3	43.9	46.5	49.1
1.02	51.7	54.3	56.9	59.5	62.1	64.7	67.3	69.9	72.5	75.1
1.03	77.7	80.3	82.9	85.5	88.1	90.7	93.3	95.9	98.5	101.1
1.04	103.7	106.3	109.0	111.6	114.2	116.8	119.4	122.0	124.6	127.2
1.05	129.8	132.4	135.0	137.6	140.3	142.9	145.5	148.1	150.7	153.3
1.06	155.9	158.6	161.2	163.8	166.4	169.0	171.6	174.3	176.9	179.5
1.07	182.1	184.8	.187.4	190.0	192.6	195.2	197.8	200.5	203.1	205.8
1.08	208.4	211.0	213.6	216.2	218.9	221.5	224.1	226.8	229.4	232.0
1.09	234.7	237.3	239.9	242.5	245.2	247.8	250.4	253.1	255.7	258.4
1.10	261.0	263.6	266.3	268.9	271.5	274.2	276.8	279.5	282.1	284.8
1.11	287.4	290.0	292.7	295.3	298.0	300.6	303.3	305.9	308.6	311.2
1.12	313.9	316.5	319.2	321.8	324.5	327.1	329.8	332.4	335.1	337.8
1.13	340.4	343.0	345.7	348.3	351.0	353.7	356.3	359.0	361.6	364.3
1.14	366.9	369.6	372.3	375.0	377.6	380.3	382.9	385.6	388.3	390.9
1.15	393.6	396.2	398.9	401.6	404.3	406.9	409.6	412.3	415.0	417.6
1.16	420.3	423.0	425.7	428.3	431.0	433.7	436.4	439.0	441.7	444.4
1.17	447.1	449.8	452.4	455.2	457.8	460.5	463.2	465.9	468.6	471.3
1.18	473.9	476.6	479.3	482.0	484.7	487.4	490.1	492.8	495.5	498.2
1.19	500.9	503.5	506.2	508.9	511.6	514.3	517.0	519.7	522.4	525.1
1.20	527.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ТАБЛИЦА ИНТЕРПОЛЯЦИИ

4-й десятичный разряд	Экстракт г/л	4-й десятичный разряд	Экстракт г/л	4-й десятичный разряд	Экстракт г/л
1	0.3	4	1.0	7	1.8
2	0.5	5	1.3	8	2.1
3	0.8	6	1.6	9	2.3

БИБЛИОГРАФИЯ

TABLE DE PLATO, d'après *Allgemeine Verwaltungsvorschrift für die Untersuchung von Wein und ähnlichen alkoholischen Erzeugnissen sowie von Fruchtsäften,* vom April 1960, Bundesanzeiger Nr. 86 vom 5. Mai 1960. - Une table très voisine se trouve dans *Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists,* Ed. A.O.A.C., Washington 1945, 815.

Таблица I

Коррективы вносятся в случае, если процентное содержание сахарозы по массе определяли при температуре, отличающейся на 20°C.

Температура	Процент по массе измеряемой в %													
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
5	±0,82	±0,87	±0,92	±0,95	±0,99									
6	±0,80	±0,82	±0,87	±0,90	±0,94									
7	±0,74	±0,78	±0,82	±0,84	±0,88									
8	±0,69	±0,73	±0,76	±0,79	±0,82									
9	±0,64	±0,67	±0,71	±0,73	±0,75									
10	±0,59	±0,62	±0,65	±0,67	±0,69	±0,71	±0,72	±0,73	±0,74	±0,75	±0,75	±0,75	±0,75	±0,75
11	±0,54	±0,57	±0,59	±0,61	±0,63	±0,64	±0,65	±0,66	±0,67	±0,68	±0,68	±0,68	±0,68	±0,67
12	±0,49	±0,51	±0,53	±0,55	±0,56	±0,57	±0,58	±0,59	±0,60	±0,60	±0,61	±0,61	±0,60	±0,60
13	±0,43	±0,45	±0,47	±0,48	±0,50	±0,51	±0,52	±0,52	±0,53	±0,53	±0,53	±0,53	±0,53	±0,53
14	±0,38	±0,39	±0,40	±0,42	±0,43	±0,44	±0,44	±0,45	±0,45	±0,46	±0,46	±0,46	±0,46	±0,45
15	±0,32	±0,33	±0,34	±0,35	±0,36	±0,37	±0,37	±0,38	±0,38	±0,38	±0,38	±0,38	±0,38	±0,38
16	±0,26	±0,27	±0,28	±0,28	±0,29	±0,30	±0,30	±0,30	±0,31	±0,31	±0,31	±0,31	±0,31	±0,30
17	±0,20	±0,20	±0,21	±0,21	±0,22	±0,22	±0,23	±0,23	±0,23	±0,23	±0,23	±0,23	±0,23	±0,23
18	±0,13	±0,14	±0,14	±0,14	±0,15	±0,15	±0,15	±0,15	±0,15	±0,15	±0,15	±0,15	±0,15	±0,15
19	±0,07	±0,07	±0,07	±0,07	±0,07	±0,08	±0,08	±0,08	±0,08	±0,08	±0,08	±0,08	±0,08	±0,08
20	0	РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ											0	
21	+0,07	+0,07	+0,07	+0,07	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08
22	+0,14	+0,14	+0,15	+0,15	+0,15	+0,15	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,15	+0,15
23	+0,21	+0,22	+0,22	+0,23	+0,23	+0,23	+0,23	+0,24	+0,24	+0,24	+0,24	+0,23	+0,23	+0,23
24	+0,29	+0,29	+0,30	+0,30	+0,31	+0,31	+0,31	+0,32	+0,32	+0,32	+0,32	+0,31	+0,31	+0,31
25	+0,36	+0,37	+0,38	+0,38	+0,39	+0,39	+0,40	+0,40	+0,40	+0,40	+0,40	+0,39	+0,39	+0,39
26	+0,44	+0,45	+0,46	+0,46	+0,47	+0,47	+0,48	+0,48	+0,48	+0,48	+0,48	+0,47	+0,47	+0,46
27	+0,52	+0,53	+0,54	+0,55	+0,55	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,55	+0,55	+0,54
28	+0,60	+0,61	+0,62	+0,63	+0,64	+0,64	+0,64	+0,65	+0,65	+0,64	+0,64	+0,64	+0,63	+0,62
29	+0,68	+0,69	+0,70	+0,71	+0,72	+0,73	+0,73	+0,73	+0,73	+0,73	+0,72	+0,72	+0,71	+0,70
30	+0,77	+0,78	+0,79	+0,80	+0,81	+0,81	+0,81	+0,82	+0,81	+0,81	+0,81	+0,80	+0,79	+0,78
31	+0,85	+0,87	+0,88	+0,89	+0,89	+0,90	+0,90	+0,90	+0,90	+0,90	+0,89	+0,88	+0,87	+0,86
32	+0,94	+0,95	+0,96	+0,97	+0,98	+0,99	+0,99	+0,99	+0,99	+0,98	+0,97	+0,96	+0,95	+0,94
33	+1,03	+1,04	+1,05	+1,06	+1,07	+1,08	+1,08	+1,08	+1,07	+1,07	+1,06	+1,05	+1,03	+1,02
34	+1,12	+1,19	+1,15	+1,15	+1,16	+1,17	+1,17	+1,17	+1,16	+1,15	+1,14	+1,13	+1,12	+1,10
35	+1,22	+1,23	+1,24	+1,25	+1,25	+1,26	+1,26	+1,25	+1,25	+1,24	+1,23	+1,21	+1,20	+1,18
36	+1,31	+1,32	+1,33	+1,34	+1,35	+1,35	+1,35	+1,35	+1,34	+1,33	+1,32	+1,30	+1,28	+1,26
37	+1,41	+1,42	+1,43	+1,44	+1,44	+1,44	+1,44	+1,44	+1,43	+1,42	+1,40	+1,38	+1,36	+1,34
38	+1,51	+1,52	+1,53	+1,53	+1,54	+1,54	+1,53	+1,53	+1,52	+1,51	+1,49	+1,47	+1,45	+1,42
39	+1,61	+1,62	+1,62	+1,63	+1,63	+1,63	+1,63	+1,62	+1,61	+1,60	+1,58	+1,56	+1,53	+1,50
40	+1,71	+1,72	+1,72	+1,73	+1,73	+1,73	+1,72	+1,71	+1,70	+1,69	+1,67	+1,64	+1,62	+1,59

Предпочтительно, чтобы колебания температуры по отношению к 20°C не превышали ± 5°C.

Метод OIV-MA-AS2-04 Метод I типа

Зола

1. Определение метода

Зольность определяется как все те продукты, которые остаются после сжигания остатка, сохранившегося после испарения вина. Поджигание проводят таким образом, чтобы все катионы (за исключением катиона аммония) превращались в карбонаты или другие безводные неорганические соли.

2. Сущность метода

Винный экстракт прокаливают при температуре от 500 до 550°C до полного сгорания (окисления) органического материала.

3. Используемое оборудование

3.1 кипящая водяная баня при 100°C;

3.2 весы с точностью измерения до 1 мг;

3.3 нагревательный или инфракрасный испаритель;

3.4 муфельная электропечь с регулируемой температурой;

3.5 эксикатор;

3.6 плоскодонная платиновая тарелка диаметром 70 мм и высотой 25 мм.

4. Проведение исследования

Пипеткой вносят 20 мл вина в предварительно тарированную платиновую чашку (исходный вес по г). Выпаривают на кипящей водяной бане, а остаток нагревают на плитке при 200°C или под инфракрасным испарителем до начала карбонизации. Когда перестанут образовываться пары, помещают посуду в электрическую муфельную печь, поддерживающую температуру 525 ± 25°C. Через 15 мин чашку вынимают из печи, добавляют 5 мл дистиллированной воды, выпаривают на водяной бане или в инфракрасном испарителе и снова нагревают остаток до 525°C в течение 10 мин.

Если сгорание (окисление) нагара не завершено, повторяют следующие операции: промывание нагара, испарение воды и зажигание. Для вин с высоким содержанием сахара целесообразно перед первым озолением добавлять в экстракт несколько капель чистого растительного масла для предотвращения чрезмерного пенообразования. После охлаждения в эксикаторе чашку взвешивают (p_1 g).

Затем вес золы в образце (20 мл) рассчитывается как $p = (p_1 - p_0)$ g.

5. Выражение результатов

Масса золы P в граммах на литр определяется с точностью до двух знаков после запятой выражением:

$$P = 50\,p.$$

Метод OIV-MA-AS2-05A Метод IV типа

Щелочность золы

1. Определение метода

Щелочность золы определяется как сумма катионов, кроме иона аммония, в сочетании с органическими кислотами в вине.

2. Сущность метода

Золу растворяют в известном (избыточном) количестве горячего стандартизированного раствора кислоты; избыток определяют титрованием с использованием в качестве индикатора метилоранжа.

3. Реагенты и используемая аппаратура

3.1. Раствор серной кислоты, 0.05 M H_2SO_4

3.2. Раствор гидроксида натрия, 0.1 M NaOH

3.3. Метиловый оранжевый, 0,1% раствор в дистиллированной воде

3.4. Кипящая водяная баня

4. Проведение исследования

К золе из 20 мл вина, содержащейся в платиновой чашке, добавляют 10 мл 0,05 М раствора серной кислоты (3.1). Помещают чашку на кипящую водяную баню примерно на 15 мин, разбивая и взбалтывая осадок стеклянной палочкой для ускорения растворения.

5. Выражение результатов

5.1. *Метод расчета*

Щелочность золы, выраженная в миллиэквивалентах на литр с точностью до одного десятичного знака, определяется выражением:

$$A = 5 (10 - n)$$

где n мл является использованным объемом гидроксида натрия, 0.1 М.

5.2. *Альтернативное определение*

Щелочность золы, выраженная в граммах на литр карбоната калия с точностью до двух знаков после запятой, определяется выражением:

$$A = 0.345 (10 - n)$$

БИБЛИОГРАФИЯ

JAULMES P., *Analyse des vins*, Librairie Poulain, Montpellier, éd., 1951, 107.

Метод OIV-MA-AS2-06 Метод IV типа

Измерение окислительно-восстановительного потенциала в винах

(Резолюция Oeno 3/2000)

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ:

Окислительно-восстановительный потенциал (EH) является измерением окислительного или восстановительного состояния среды. В области энологии кислород и окислительно-восстановительный потенциал являются двумя важными факторами в предферментационной обработке урожая винограда, процессе виноделия, выращивании и хранении вина.

Настоящим представляются предложения по оборудованию, предназначенному для измерения окислительно-восстановительного потенциала в винах, и рабочему методу проведения измерений в нормальных условиях. Этот метод не подвергался какому-либо совместному анализу, учитывая очень изменчивый характер окислительно-восстановительного состояния конкретного вина, что затрудняет реализацию этого шага в процессе валидации. Как результат, метод класса 4[1] предназначен в основном для производства.

2. Сущность метода

Окислительно-восстановительный потенциал среды определяется как разность потенциалов между погруженным в эту среду нержавеющим электродом и стандартным водородным электродом, связанным со средой. Действительно, можно измерить только разницу окислительно-восстановительных потенциалов двух связанных систем. Следовательно, окислительно-восстановительный потенциал водородного электрода считается равным нулю, и все окислительно-восстановительные потенциалы сравниваются с ним. Окислительно-восстановительный потенциал представляет собой измеряемую величину, позволяющую выразить мгновенное физико-химическое состояние раствора. Только потенциометрический объемный анализ пар окисления-восстановления и оценка соотношения окислитель/восстановитель могут дать истинное количественное измерение. Окислительно-восстановительный потенциал измеряется с помощью комбинированных электродов, будь то в вине или в другом растворе. Эта система обычно включает использование платинового электрода (измерительного электрода) и серебряного или хлоридно-ртутного электрода (электрода сравнения).

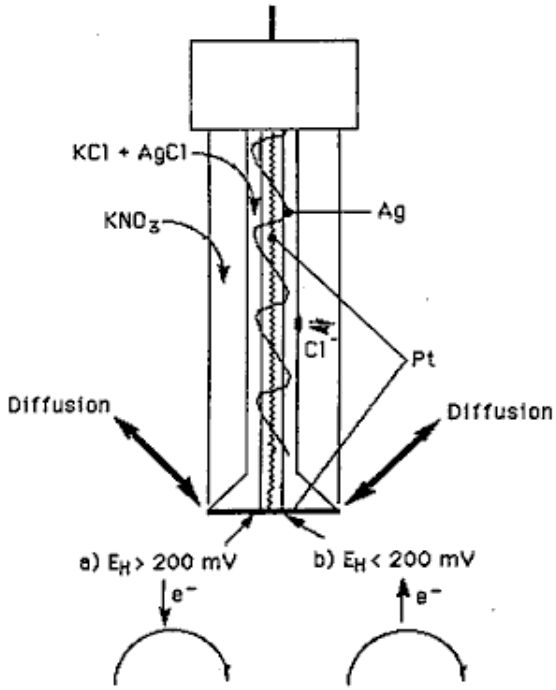
3. ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Хотя существует несколько типов электродов, рекомендуется использовать электрод, адаптированный для измерения EH в вине. Рекомендуется использовать комбинированный электрод с двойной оболочкой, соединенный

[1] В соответствии с классификацией, подробно описанной в Codex Alimentarius.

с электродом сравнения (см. рисунок). Эта система включает в себя измерительный электрод и электрод сравнения с двойной оболочкой, оба из которых связаны с иономером. Внутренняя оболочка электрода сравнения заполнена раствором 17.1% KNO_3; следовые количества AgCl; следовые количества Triton X-100; 5% KCL; 77.9% деионизированная вода; а для измерительного электрода раствор состоит из <1% AgCL; 29.8% KCL; и 70% деионизированной воды.

Модифицированный комбинированный электрод



Окислитель Восстановленный Восстановитель Окисленный

4. ОЧИСТКА И КАЛИБРОВКА ЭЛЕКТРОДОВ

4.1. *Калибровка*

Электроды калибруются с использованием растворов с известными постоянными окислительно-восстановительными потенциалами. Используют эквимолярный раствор (10 мМ/л) феррицианида и цианистого железа калия. Его состав: 0.329г $K_3Fe(CN)_6$; 0.422г $K_4Fe(CN)_6$; 0.149г KCl до 1000 мл воды. При 20 °C раствор имеет окислительно-восстановительный потенциал 406 мВ (±5 мВ), но потенциал меняется со временем, что требует хранения раствора в темноте не более двух недель.

4.2. *Очистка платины в электроде*

Платиновый электрод следует очищать, погружая его в раствор 30% перекиси водорода по объему на один час, затем промывая водой. Полная очистка в воде требуется после каждой серии измерений. Система обычно очищается после каждой недели использования.

5. Проведение исследования

5.1. *Заполнение внутренней оболочки*

Состав двойной оболочки варьируется в зависимости от типа среды, для которой измеряется ЕН (таблица ниже).

Таблица

Состав раствора наполнителя в двойной оболочке электрода в зависимости от измеряемой среды

Среда для измерения	Состав раствора оболочки
1 Сухие вина	Этанол 12% об., 5 г винной кислоты, NaOH N до pH 3.5, дистиллированная вода до1000 мл
2 Сладкие вина	Раствор 1 плюс 20 г/л сахарозы
3 Специальные сладкие вина	Раствор 2 плюс 100 мг/л SO_2 ($KHSO_3$)
4 Винные дистилляты	Этанол 50% об., уксусная кислота до pH 5, вода дистиллированная до 1000 мл.

5.2. Балансировка электрода с измеряемой средой

Перед проведением любых измерений электроды должны быть откалиброваны в буферном растворе Михаэлиса, затем стабилизированы в течение 15 минут в вине, если измерения проводятся в вине. Далее, для измерений, проводимых на месте, измерения считываются после погружения электродов в среду на 5 минут. Для лабораторных измерений индексом стабильности является отношение ΔЕН(мВ) / Т (минуты); когда этот показатель ≤ 0.2, то потенциал может быть определен.

5.3. *Измерения в практических условиях*

Измерения систематически проводятся на месте без каких-либо действий, которые могут изменить значения окислительно-восстановительного потенциала. При проведении измерений в хранилищах, бочках, чанах и т. д. следует соблюдать осторожность и регистрировать температуру, pH и содержание растворенного кислорода (метод в стадии подготовки) одновременно с измерением ЕН, поскольку эти измерения впоследствии будут использоваться для интерпретации результатов. Для вин в бутылках измерение проводится в вине после выдержки в помещении с

температурой 20 °C, сразу после открытия емкости, при постоянном потоке азота и после погружения всего блока электродов в бутылку.

5.4. *Выражение результатов*

Результаты записывают в мВ по сравнению со стандартным водородным электродом.

Метод OIV-MA-AS2-07A

Хроматические характеристики

2. Сущность метода

Спектрофотометрический метод, который позволяет определить трехцветные значения и три коэффициента цветности, необходимые для определения цвета, как описано CIE (Международная комиссия по освещению).

ИСКЛЮЧЕН

(заменено на OIV-MA-AS2-11)

Метод OIV-MA-AS2-07B Метод IV типа

Хроматические характеристики

1. Определение метода

«Хроматическими характеристиками» вина являются его яркость и цветность. Яркость зависит от коэффициента пропускания и обратно пропорциональна интенсивности цвета вина. Цветность зависит от доминирующей длины волны (характеризующая оттенок) и чистоты.

Условно, а также для удобства хроматические характеристики красных и розовых вин описывают интенсивностью цвета и оттенка в соответствии с методикой, принятой в качестве рабочего метода.

2. Сущность метода

(применимо к красным и розовым винам)

Спектрофотометрический метод, при котором хроматические характеристики выражаются условно, как указано ниже:

- Интенсивность цвета определяется суммой коэффициентов поглощения (или оптических плотностей) при использовании оптического пути длиной 1 см и излучений с длинами волн 420, 520 и 620 нм.
- Оттенок выражается как отношение поглощения при 420 нм к поглощению при 520 нм.

3. Метод работы

3.1. *Используемое оборудование*

3.1.1 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения в диапазоне от 300 до 700 нм.

3.1.2 Стеклянные кюветы (согласованные пары) с оптическим путем b, равным 0.1, 0.2, 0.5, 1 и 2 см.

3.2. *Подготовка образца*

Если вино мутное, осветлить его центрифугированием; из молодых или игристых вин большая часть углекислого газа должна быть удалена путем перемешивания в вакууме.

3.3. *Проведение исследования*

Оптический путь *b* используемой стеклянной кюветы должен быть выбран таким образом, чтобы измеренное поглощение A находилось в пределах от 0.3 до 0.7.

Проводят спектрофотометрические измерения, используя дистиллированную воду в качестве эталонной жидкости, в кювете с тем же оптическим путем *b*, чтобы установить ноль на шкале оптической плотности прибора при длинах волн 420, 520 и 620 нм.

Используя соответствующий оптический путь *b*, определяют абсорбцию вина на каждой из этих трех длин волн.

3.4. *Расчеты*

Рассчитывают коэффициенты поглощения для оптического пути длиной 1 см для трех длин волн путем деления найденных коэффициентов поглощения (A420, A520 и A620) на *b* в см.

3.5. *Выражение результатов*

Интенсивность цвета I обычно определяется как:

$$I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

и выражается с точностью до трех знаков после запятой.

$$N = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

и выражается с точностью до трех знаков после запятой.

ТАБЛИЦА 1

Преобразование поглощения в коэффициент пропускания (T%)

Метод: находят первую десятичную цифру значения абсорбции в левом столбце (0-9) и вторую десятичную цифру в верхней строке (0-9).

Выбирают число на пересечении столбца и строки: чтобы найти коэффициент пропускания, делят число на 10, если поглощение меньше 1, на 100, если между 1 и 2, и на 1000, если между 2 и 3.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	23	22	22	21	21	20	20	19	19	19
	18	18	17	17	16	16	16	15	15	15
	14	14	14	14	13	13	13	12	12	12
	11	11	11	11	10	9	9	10	10	9
	9	9	9	8	8	8	8		7	8
	7		7	7	6	7	6	6	6	6
	6	5	6	5	5	5	5	5	5	5
	4	5	4	4	4		4	4	4	4
	3	4	3	4	4	3	3	3	3	3
	3	3	3	2	3	2	3	2	3	2

Пример:

Поглощение		0.47	1.47	2.47	3.47
T%	33.9%	3.4%	0.3%	0%	

Коэффициент пропускания (T%) выражается с точностью до 0,1%.

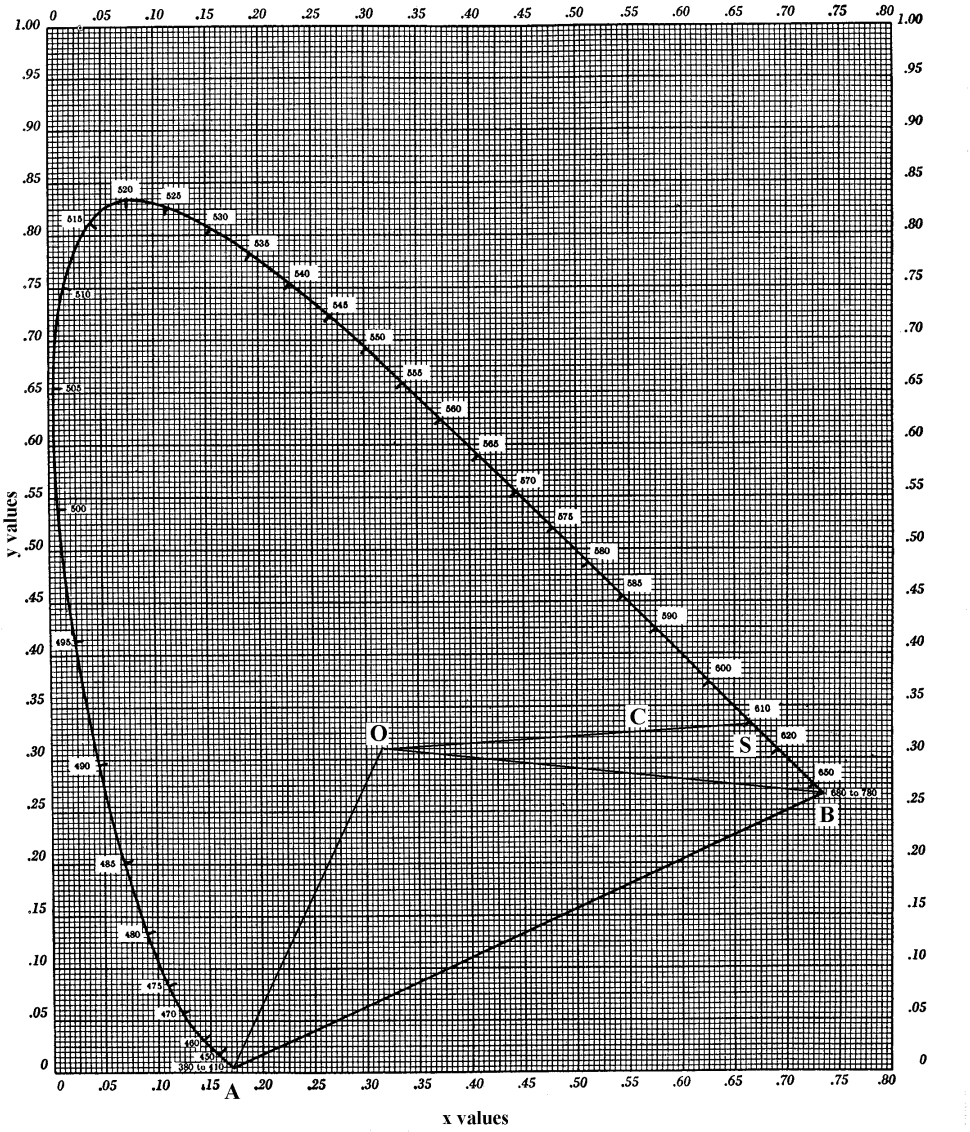


РИСУНОК 1

Диаграмма цветности, показывающая геометрическое расположение всех цветов спектра

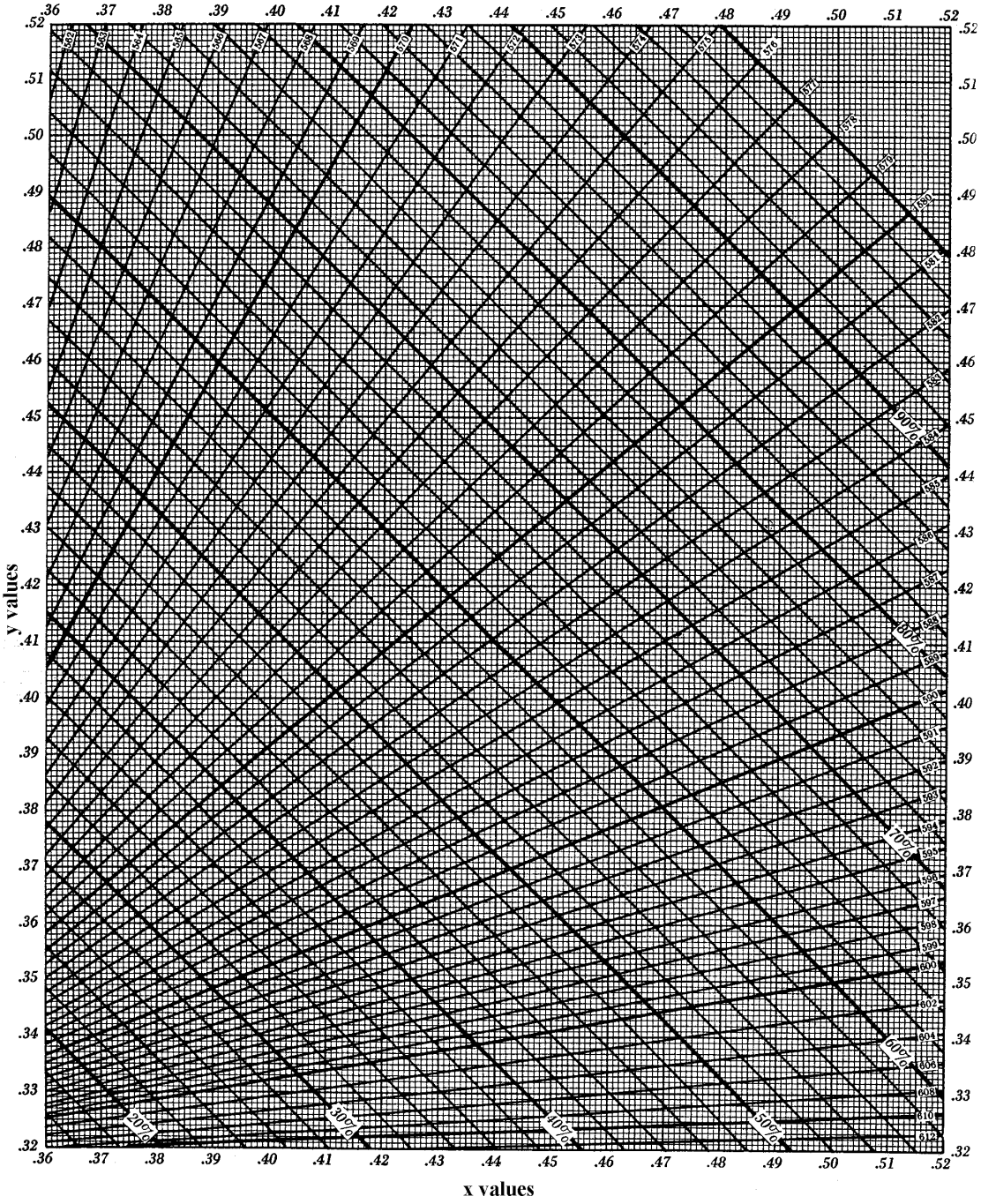


РИСУНОК 2

Диаграмма цветности для чистых красных вин и кирпично-красных вин

Метод OIV-MA-AS2-08 Метод IV типа

Мутность вина

(Резолюция Oeno 4/2000)

Определение с помощью нефелометрического анализа

1. Предупреждение

Измерения мутности в значительной степени зависят от конструкции используемого оборудования. Поэтому сравнительные измерения одного прибора с другим невозможны, если не используется один и тот же принцип измерения.

Основными известными источниками ошибок, которые связаны с типом используемого турбидиметра, являются:

- влияние рассеянного света,
- влияние цвета продукта, особенно при низких значениях мутности,
- электронный сдвиг из-за старения электронных компонентов,
- тип источника света, фотодетектора, а также размеры и тип измерения

В настоящем методе используется нефелометр, включающий **двойной пучок света с оптической компенсацией.**

Данная категория приборов позволяет выравнивать: электронный сдвиг, колебания сетевого напряжения и, частично, цвет вина. Кроме того, калибровка отличается высокой стабильностью.

Следует отметить, что данный метод не подходит для сопоставления данных из различных источников, принимая во внимание невозможность проведения совместного анализа.

2. Цель

Целью данного документа является описание оптического метода, позволяющего измерить показатель мутности (или диффузии) вина.

3.Область применения

Данный метод используется при отсутствии приборов, позволяющих абсолютно точно дублировать измерения от одного прибора к другому, а также полностью компенсировать цвет вина. Поэтому результаты приводятся только в информационных целях и должны рассматриваться с осторожностью.

Прежде всего, данная методика предназначена для использования на производстве, где она является наиболее объективным критерием измерения прозрачности.

Данный метод не может быть проверен в соответствии критериями, признанными на международном уровне и будет отнесен к классу **4**[1]

4. Сущность метода

Мутность – это оптический эффект.

Индекс диффузии является неотъемлемым свойством жидкостей, позволяющим описать их оптический вид. Этот оптический эффект возникает из-за присутствия очень мелких частиц, рассеянных в жидкой дисперсионной среде. Показатель преломления этих частиц отличается от показателя преломления дисперсионной среды.

Если через некоторое количество оптически чистой воды, помещенной в контейнер определенного объема, провести свет и измерить световой поток, рассеянный по отношению к падающему пучку, то зарегистрированное значение этого рассеянного потока позволит описать молекулярную диффузию в воде.

Если значение, полученное для воды, проанализированной таким образом, больше, чем значение молекулярной диффузии, которое остается постоянным для данной длины волны, того же падающего потока при том же измерении угла, в резервуаре той же формы и при данной температуре, разница может быть отнесена к свету, рассеянному твердыми, жидкими или газообразными частицами, взвешенными в воде.

Измерение рассеянного светового потока (выполненное по описанию) является нефелометрическим измерением.

5. Определения

5.1. *Мутность*

Уменьшение прозрачности жидкости из-за присутствия нерастворенных веществ.

5.2. *Единицы измерения индекса мутности*

Используемая единица мутности: NTU - НЕФЕЛОМЕТРИЧЕСКАЯ ЕДИНИЦА МУТНОСТИ, которая представляет собой значение, соответствующее измерению света, рассеянного стандартной суспензией формазина, приготовленной, как описано в пункте 6.2.2, под углом 90° к направлению падающего пучка.

6. Приготовление эталонной суспензии формазина (1**)**

6.1. *Реактивы*

Все реактивы должны быть признанного аналитического качества и храниться в стеклянных колбах.

6.1.1 Вода для приготовления контрольных растворов.

Фильтрующую мембрану с размером пор 0,1 мкм (аналогичные используются в бактериологии) замачивают на один час в 100 мл дистиллированной воды. 250 мл дистиллированной воды дважды фильтруют через мембрану и сохраняют воду для приготовления стандартных растворов.

(1) Необходимо соблюдать меры предосторожности при использовании, так как формазин токсичен.

6.1.2. Растворы формазина ($C_2H_4N_2$)
Соединение, известное как формазин, формула которого $C_2H_4N_2$, не является общедоступным. Его можно получить с помощью следующих растворов:
Раствор А: растворяют 10,0 г гексаметилентетрамина $(CH_2)_6N_4$ в дистиллированной воде, приготовленной в соответствии с инструкциями в п. 6.1.1. Затем заполняют дистиллированной водой до объема 100 мл.
Раствор Б: растворяют 1,0 г сульфата гидразиния, $N_2H_6SO_4$, в дистиллированной воде, приготовленной в соответствии с инструкцией в п. 6.1.1. Затем наполняют до объема 100 мл дистиллированной водой, приготовленной в соответствии с пунктом 6.1.1.

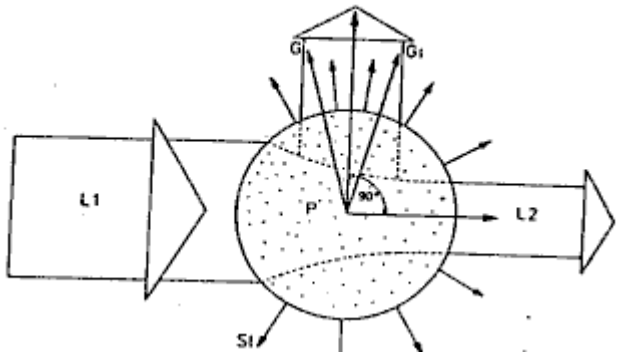
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Сульфат гидразиния ядовит и может быть опасен как канцероген.

6.2 9. Проведение исследования

Смешивают 5 мл раствора А и 5 мл раствора В. Разбавляют раствор до объема 100 мл водой через 24 часа при температуре 25 °C ± 3 °C (6.1.1). Мутность этого стандартного раствора составляет 400 NTU.
Раствор может храниться примерно 4 недели при комнатной температуре в темноте.
При разбавлении до 1/400 приготовленной дистиллированной водой будет получена мутность 1 NTU.
Этот раствор остается стабильным в течение недели.

Примечание: стандартные растворы формазина сравнивались со стандартными растворами на основе полимеров. Наблюдаемые различия можно считать незначительными.
Тем не менее, стандартные растворы на основе полимеров имеют следующие недостатки: они очень дороги и имеют ограниченный срок службы. С ними нужно обращаться осторожно, чтобы избежать разрушения частиц полимера, так как разрушение изменит значение мутности. Использование полимеров предлагается в качестве альтернативы формазину.

7. Принцип оптического измерения



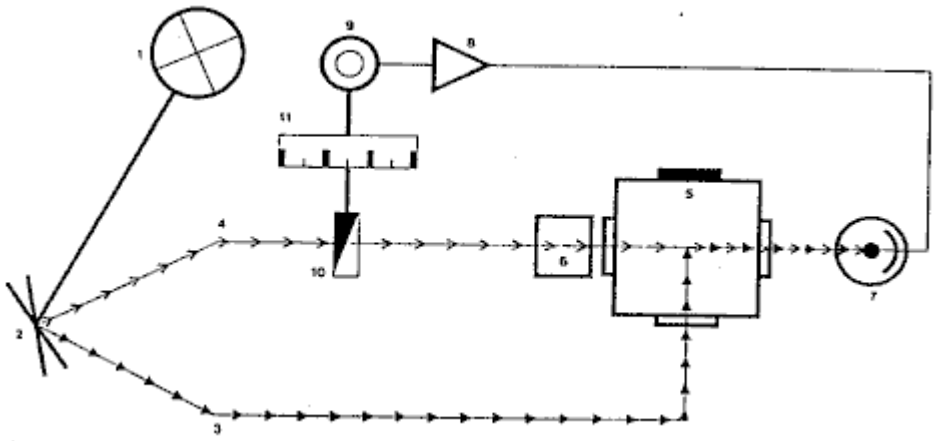
S1

Принцип измерения:
L1 = Падающий пучок света
L2 = Пучок после прохождения через образец
P = Образец
St = Рассеянный свет
G/G1 = Ограничение лучей рассеянного пучка света, используемого для измерения

Рассеянный свет следует наблюдать под углом 90° к направлению распространения падающего пучка.

8. Аппаратура

8.1. Оптический принцип работы двухпучкового нефелометра с оптической компенсацией



Источник света (1), работающий от электрической сети, проецирует пучок света на колеблющееся зеркало (2), которое попеременно отражает измерительный луч (3) и луч сравнения (4) с частотой приблизительно 600 раз в секунду.
Измерительный луч (3) проходит через измеряемую жидкость (5), а луч сравнения (4) проходит через оптически стабильную стандартную жидкость для сравнения мутности (6).
Свет, рассеиваемый частицами, создающими мутность в жидкости (5), и свет, рассеиваемый стандартным раствором для сравнения (6), попеременно попадают на фотоэлемент (7).
Таким образом, фотоэлемент принимает измерительный луч (3) и луч сравнения (4), имеющие одинаковую частоту, но разные световые интенсивности.
Фотоэлемент (7) преобразует эти неравные интенсивности света в электрический ток, который, в свою очередь, усиливается (8) и передается на синхронный двигатель (9), функционирующий как серводвигатель.
Данный двигатель с помощью механической измерительной диафрагмы (10) изменяет интенсивность управляющего луча до тех пор, пока оба пучка не попадают на фотоэлемент с одинаковой интенсивностью свечения.
Данное равновесное состояние позволяет определить содержание твердых частиц в жидкости.
Абсолютное значение измерения зависит от размеров стандартного пучок сравнения и положения диафрагмы.

8.2. Характеристики

Примечание: Для измерения данных показателей, независимо от цвета вина, нефелометр должен быть оснащен дополнительным интерференционным фильтром, позволяющим проводить измерения при длине волны 620 нм. Однако интерференционный фильтр не нужен, если источник света инфракрасный.

8.2.1 Ширина спектральной полосы падающего излучения должна быть меньше или равна 60 нм.

8.2.2 В параллельности падающего излучения не должно быть расхождения, а конвергенция не должна превышать 1,5°.

8.2.3 Угол измерения между оптической осью падающего излучения и оптической осью рассеянного излучения должен составлять 90° ± 2,5°.

8.2.4 Аппаратура не должна давать погрешность из-за рассеянного света более чем:

- 0,01 NTU случайной световой погрешности в диапазоне от: 0 - 0,1 NTU.

9. Метод измерения

9.1. *Проверка аппаратуры*

Перед выполнением любого измерения или серии измерений проверяется правильность электрической и механической работы аппаратуры в соответствии с рекомендациями производителя.

9.2. *Проверка регулировки шкалы измерений*

Прежде чем проводить какое-либо измерение или серию измерений, используется предварительно откалиброванный прибор, чтобы проверить, соответствует ли регулировка шкалы измерений принципу, лежащему в основе его конструкции.

9.3 *Очистка измерительной ячейки*

Измерительная ячейка тщательно очищается перед всеми анализами. Принимаются все необходимые меры предосторожности, чтобы избежать попадания пыли в прибор и особенно в измерительная ячейка, перед и во время определения индекса мутности.

9.4. *Проведение измерений*

- Рабочая температура должна составлять от 15°C до 25°C (учитывают температуру измеряемого вина, чтобы обеспечить правильное сравнение). Перед проведением измерения тщательно гомогенизируют продукт и, не делая резких движений, которые могли бы привести к образованию эмульсии, извлекают колбу с анализируемым продуктом.
- Измерительную ячейку промывают дважды небольшим количеством анализируемого продукта.

- Осторожно заливают анализируемый продукт в измерительную ячейку, стараясь избежать каких-либо турбулентностей в потоке жидкости, поскольку это приведет к образованию воздушных пузырьков. Проводят тестовые измерения.
- Выжидают одну минуту, если значение индекса стабильно.
- Записывают полученный индекс мутности.

10. Выражение результатов

Показатель мутности анализируемого вина регистрируется и выражается в:

*** NTU**

* если мутность менее 1 NTU, она округляется до 0,01 NTU
* если мутность составляет от 1 NTU до 10 NTU, она округляется до 0,1 NTU
* если мутность составляет от 10 NTU до 100 NTU, она округляется до 1 NTU

11. Протокол анализа

Протокол должен содержать следующую информацию:

а) ссылка на данный метод
б) результаты, выраженные как указано в пункте 10
в) любые детали или явления, которые могли повлиять на результаты.

БИБЛИОГРАФИЯ

-AFNOR
Standard NF EN 27027 (ISO 7027) - April 1994
"Water Quality = Turbidity Analysis"
-OIV
Compendium of International Methods for Spirits, Alcohols and the Aromatic
Fractions in Beverages - 1994
"Turbidity - Nephelometric Analysis Method"
SIGRIST PHOTOMETER SA, CH 6373 Ennetburgen
"Excerpts from technical instructions for nephelometers

Метод OIV-MA-AS2-09

Метод изотопного соотношения $^{18}O/ ^{16}O$ содержания воды в винах (Резолюция oeno 2/96)

ИСКЛЮЧЕН
(заменен на OIV-MA-AS2-12)

Метод OIV-MA-AS2-10 Метод IV типа

Индекс Фолина-Чокальтеу

1. Определение

Индекс Фолина-Чокальтеу – это результат, полученный при применении метода, описанного ниже.

2. Сущность метода

Все фенольные соединения, содержащиеся в вине, окисляются реактивом Фолина-Чокальтеу. Этот реагент образуется из смеси фосфорновольфрамовой кислоты, $H_3PW_{12}O_{40}$, и фосфомолибденовой кислоты, $H_3PMo_{12}O_{40}$, которая после окисления фенолов восстанавливается до смеси синих оксидов вольфрама, W_8O_{23}, и молибдена, Mo_8O_{23}. Полученная синяя окраска имеет максимум поглощения в области 750 нм и пропорциональна общему количеству первоначально присутствующих фенольных соединений.

3. Аппаратура

Стандартная лабораторная аппаратура, в частности:

3.1 Волюметрические колбы объемом 100 мл.

3.2 Спектрофотометр, 750 нм.

4. Реактивы

4.1 Реактив Фолина-Чокальтеу

Этот реактив можно приобрести в готовом для использования виде.

В качестве альтернативы его можно приготовить следующим образом: растворяют 100 г вольфрамат натрия, $Na_2WO_4.2H_2O$, и 25 г молибдата натрия, $Na_2MoO_4.2H_2O$, в 700 мл дистиллированной воды. Добавляют 50 мл фосфорной кислоты 85% (U_{20} = 1,71 г/мл) и 100 мл концентрированной соляной кислоты (U_{20} = 1,19 г/мл). Доводят до кипения и настаивают в течение 10 часов. Затем добавляют 150 г сульфата лития, $Li_2SO_4.H_2O$, и несколько капель брома и кипятят в течение 15 минут. Дают остыть и разбавляют дистиллированной водой до одного литра.

4.2 Безводный карбонат натрия, Na_2CO_3, в концентрации 20% (м/об).

5. Проведение исследования

5.1 Красные вина

В колбу объемом 100 мл (3.1) вводят перечисленное ниже строго в следующем порядке:

1 мл вина, предварительно разбавленного 1/5,

50 мл дистиллированной воды,

5 мл реактива Фолина-Чокальтеу (4.1),

20 мл раствора карбоната натрия (4.2).

Доводят до 100 мл дистиллированной водой.

Перемешивают до растворения. Оставляют на 30 минут для стабилизации реакции. Определяют поглощение при 750 нм через длину пути 1 см по отношению к пустому образцу, приготовленному с использованием дистиллированной воды вместо вина.

Если абсорбция не находится в области 0,3, производят соответствующее разбавление.

5.2 *Белые вина*

Проводят аналогичную процедуру с 1 мл неразбавленного вина.

6. Выражение результатов

6.1 Расчеты

Результат выражается в виде индекса, полученного путем умножения абсорбции на 100 для красных вин, разбавленных 1/5 (либо на соответствующий коэффициент для других разбавлений), и на 20 для белых вин.

6.2 *Прецизионность*

Разница между результатами двух анализов, проведенных одновременно или друг за другом одним и тем же аналитиком, не должна превышать 1. Высокой точности результатов способствует использование абсолютно чистой аппаратуры (волюметрических колб и кювет спектрофотометра).

Метод OIV-MA-AS2-11 Метод I типа

Определение хроматических характеристик по данным CIELab

(Резолюция Oeno 1/2006)

1. Введение

Цвет вина является одним из наиболее важных доступных для нас визуальных признаков, поскольку он предоставляет значительный объем очень важной информации.

Цвет – это ощущение, которое мы воспринимаем визуально в результате преломления или отражения света на поверхности предметов. Цвет имеет прямую связь светом и зависит от вида света (освещающий или освещаемый) мы видим тот или иной цвет. Свет очень изменчив, в определенной степени, как и цвет.

Вино поглощает часть падающих лучей света и отражает другую, которая попадает в глаза наблюдателя, заставляя его испытывать ощущение цвета. Например, ощущение очень темного красного вина почти полностью связано с тем, что падающее излучение поглощается вином.

1.1. Область применения

Целью данного спектрофотометрического метода является определение процесса измерения и расчета *хроматических характеристик* вин и других напитков, полученных из *трихроматических компонентов*: X, Y и Z, в соответствии с Международной комиссией по освещению (CIE, 1976), путем проведения попыток имитировать реального наблюдателя в отношении его восприятия цвета.

1.2. Сущность метода и терминология

Цвет вина может быть описан с помощью трех характеристик или определенных качеств зрительных ощущений: тон, насыщенность и светлота.

Тон – сам цвет, являющийся наиболее характерным: красный, желтый, зеленый или синий. *Светлота* – это характеристика зрительного ощущения, в соответствии с которым вино кажется более или менее светлым. *Насыщенность,* или степень окрашенности, связана с большей или меньшей интенсивностью цвета. Сочетание этих трех компонентов позволяет нам определить многочисленные оттенки цвета, которые присущи винам.

Хроматические характеристики вина определяются колориметрическими координатами или координатами цветности (рис. 1): светлота (L*), красный/зеленый компонент цвета (a*) и синий/желтый компонент цвета (b*); и производными величинами: насыщенность (C*), тон (H*) и хроматичность [(a*, b*) или (C*, H*)]. Другими словами, эта система цвета или пространства CIELab основана на последовательном или непрерывном отображении в пространстве декартовых координат по 3 ортогональным осям: L*, a* и b* (рис. 2 и 3). Координата L* представляет светлоту (L* = 0 черный и L* = 100 бесцветный), a* зеленый/красный компонент цвета (a*>0 красный, a*<0 зеленый) и b* синий/желтый компонент цвета (b*>0 желтый, b*<0 синий).

1.2.1. Светлота

Обозначается символом L*, и определяется в соответствии с формулой:

$$L^{*}=116(Y/Y_n)^{1/3}-16 \qquad \textbf{(I)}$$

Напрямую связана с визуальным ощущением яркости.

1.2.2. Компонент красного/зеленого цвета

Обозначается символом a*, и он определяется в соответствии со следующей математической формула:

$$a^{*}=500[(X/X_n)-(Y/Y_n)] \quad \textbf{(I)}$$

1.2.3. Компонент желтого/синего цвета

Символ – b*, он определяется в соответствии со следующей математической формулой:

$$b^{*}=200-[(Y/Y_n)^{1/3}-(Z/Z_n)^{1/3} \quad \textbf{(I)}$$

1.2.4. Насыщенность

Символ насыщенность – C*, он определяется в соответствии со следующей математической формулой:

$$C^{*} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$$

1.2.5. Тон

Символ тона – H*, его единица шестидесятиричный градус(º), он определяется в соответствии со следующей математической формулой:

$$H^{*} = tg^{-1}\,(b^{*}/a^{*})$$

1.2.6 Разница в тоне между двумя винами

Символ ΔH^{*} определяется в соответствии со следующей математической формулой:

$$\Delta H^{*} = \sqrt{(\Delta E^{*})^{2} - (\Delta L)^{2} - (\Delta C)^{2}}$$

(I) См. пояснения в Приложении I

1.2.7. Общая колориметрическая разница между двумя винами

Символ ΔE^{*} определяется в соответствии со следующей математической формулой:

$$\Delta E^{*} = \sqrt{(\Delta L^{*})^{2} + (\Delta a)^{2} + (\Delta b)^{2}} = \sqrt{(\Delta L^{*})^{2} + (\Delta C)^{2} + (\Delta H)^{2}}$$

1.3. Реактивы и продукты

Дистиллированная вода

1.4. Аппаратура и оборудование

Стандартные лабораторное оборудование и, в том числе, нижеперечисленное:

1.4.1. Спектрофотометр для проведения измерений коэффициента светопроницаемости при длине волны от 300 до 800 нм с осветителем D65 и наблюдателем, расположенным под углом 10º. Используют прибор с разрешением, равным или превышающим 5 нм и, по возможности со сканированием.

1.4.2. Компьютерное оборудование и соответствующая программное обеспечение, которое при подключении к спектрофотометру, облегчит вычисление колориметрических координат (L*, a* и b*) и их производных величин (C* и H*).

1.4.3. Стеклянные кюветы, выпускаемые парами, оптическая толщина 1, 2 и 10 мм.

1.4.4. Микропипетки для работы с объемом от 0,020 до 2 мл.

1.5. Пробоотбор и пробоподготовка

При отборе проб должны соблюдаться все понятия однородности и репрезентативности.

При помутнении вина его необходимо осветлить центрифугированием.

Для молодых или игристых вин необходимо удалить как можно больше углекислого газа путем вакуумного перемешивания или с помощью звукового генератора.

1.6. Проведение исследования

- Выбирают пару кювет для спектрофотометрического измерения, убедившись, что верхний предел измерения в линейном диапазоне спектрофотометра не превышен. Для примера, для белых и розовых вин рекомендуется использовать кюветы с 10 мм оптической толщины, а для красных вин – кюветы с 1 мм оптической толщиной.
- После получения и подготовки образца, измеряют его светопропускание (от 380 до 780 нм) через каждые 5 нм, используя дистиллированную воду в качестве эталона в кювете с такой же оптической толщиной, чтобы установить нулевую линию или белую линию. Применяют осветитель D65 и градус наблюдения 10º.
- Если оптическая толщина кюветы меньше 10 мм, то перед расчетом необходимо довести коэффициент светопропускания до 10 мм: L*, a*, b*, C* и H*.

Итог:

Спектральные измерения коэффициента светопропускаемости от 780 до 380 нм
Интервал: 5 нм
Кюветы: использование в соответствии с интенсивностью вина: 1 см (белые и розовые вина) и 0,1 см (красные вина).
Осветитель D65
Контрольная схема наблюдения 10º

1.7. Расчеты

Спектрофотометр должен быть подключен к компьютерной программе для расчета колориметрических координат (L*, a* и b*) и их производных величин (C* и H*), с использованием соответствующих математических алгоритмов.
Если компьютерная программа не доступна, см. Приложение I о дальнейших действиях.

1.8. Выражение результатов

Колориметрические характеристики вина определяются в соответствии с рекомендациями, приведенными ниже в таблице.

Колориметрические х-ки	**Символ**	**Ед.**	**Интервал**	**Децималы**
Светлота	L^*		0-100 0 черный 100 бесцветный	1
Компонент красного/зеленого цвета	a^*		>0 красный <0 зеленый	2
Компонент желтого/синего цвета	b^*		>0 желтый <0 синий	2
Насыщеность	C^*			2
Тон	H^*	º	0-360º	2

1.9. Числовой образец

На рисунке 4 показаны значения колориметрических характеристик и диаграмма цветности молодого красного вина для следующих значений:
X = 12.31; Y = 60.03 и Z = 10.24
L* = 29.2
a* = 55.08 b* = 36.10
C* = 66.00
H* = 33.26º

2. Прецизионность

Приведенные выше данные были получены в результате двух межлабораторных испытаний 8 образцов вина с прогрессивными хроматическими характеристиками, с дубликатами для слепой пробы в соответствии с рекомендациями единого протокола для совместных исследований, нацеленных на проверку валидности метода анализа.

2.1. Колориметрическая характеристика L* (светлота, 0-100)

Идентификация образца	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Год проведения межлаб.анализа	2004	2002	2004	2004	2004	2004	2002	2004
Число участвующих лабораторий	18	21	18	18	17	18	23	18
Число лабораторий после устранения выбросов	14	16	16	16	14	17	21	16
Среднее значение (X)	96.8	98.0	91.6	86.0	77.4	67.0	34.6	17.6
Стандартное откл.повторяемости (s_r)	0.2	0.1	0.2	0.8	0.2	0.9	0.1	0.2
Среднее отклонение повторяемости	0.2	0.1	0.3	1.0	0.3	1.3	0.2	1.2
Предел повторяемости (r) (2.8 x s_r)	0.5	0.2	0.7	2.2	0.7	2.5	0.2	0.6
Стандартное отклонение воспроизводимости (s_R)	0.6	0.1	1.2	2.0	0.8	4.1	1.0	1.0
Относительное стандартное откл. воспроизводимости (RSD_R) (%)	0.6	0.1	1.3	2.3	1.0	6.1	2.9	5.6
Предел воспроизв. (R) (2.8 x s_R)	1.7	0.4	3.3	5.5	2.2	11.5	2.8	2.8

2.2. Колориметрическая координата a* (зеленый/красный)

Идентификация пробы	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Год проведения межлаб.анализа	2004	2002	2004	2004	2004	2004	2002	2004
Число участвующих лабораторий	18	21	18	18	17	18	23	18
Число лабораторий, принятых после устранения отклонений	15	15	14	15	13	16	23	17
Среднее значение (X)	-0.26	-0.86	2.99	11.11	20.51	29.29	52.13	47.55
Относительное откл.повторяемости (s_r)	0.17	0.01	0.04	0.22	0.25	0.26	0.10	0.53
Среднее отклонение повторяемости (RSD_r) (%)	66.3	1.4	1.3	2.0	1.2	0.9	0.2	1.1
Предел повторяемости (r)(2.8 x (s_r)	0.49	0.03	0.11	0.61	0.71	0.72	0.29	1.49
Стандартное отклонение воспроизводимости (s_r)	0.30	0.06	0.28	0.52	0.45	0.98	0.88	1.20
Относительное отклонение воспроизводимости (RSD_R) (%)	116.0	7.5	9.4	4.7	2.2	3.4	1.7	2.5
Предел воспроизводимости (R)(2.8 x sr)	0.85	0.18	0.79	1.45	1.27	2.75	2.47	3.37

2.3. Колориметрическая координата b* (синий/желтый)

Идентификация пробы	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Год проведения межлаб.анализа	2004	2002	2004	2004	2004	2004	2002	2004
Число участвующих лабораторий	17	21	17	17	17	18	23	18
Число лабораторий, принятых после устранения отклонений	15	16	13	14	16	18	23	15
Среднее значение $\overline{(X)}$	10.95	9.04	17.75	17.10	19.68	26.51	45.82	30.07
Стандартное откл.повторяемости (sr)	0.25	0.03	0.08	1.08	0.76	0.65	0.15	0.36
Среднее отклонение повторяемости (RSDr) (%)	2.3	0.4	0.4	6.3	3.8	2.5	0.3	1.2
Предел воспроизводимости (r)(2.8 x (s_R)	0.71	0.09	0.21	3.02	2.12	1.83	0.42	1.01
Стандартное отклонение воспроизводимости (s_R)	0.79	0.19	0.53	1.18	3.34	2.40	1.44	1.56
Среднее отклонение воспроизводимости (RSDR) (%)	7.2	2.1	3.0	6.9	16.9	9.1	3.1	5.2
Предел воспроизводимости (R)(2.8 x s_R)	2.22	0.53	1.47	3.31	9.34	6.72	4.03	4.38

БИБЛИОГРАФИЯ

- Vocabulaire International de l'Éclairage. Publication CIE 17.4.- Publication I.E.C. 50(845). CEI(1987). Genève. Suisse.
- Colorimetry, 2nd Ed.- Publication CIE 15.2 (1986) Vienna.
- Colorimetry, 2nd Ed.- Publication CIE 15.2 (1986) Vienna.
- Kowaliski P. ± Vision et mesure de la couleur. Masson ed. Paris 1990
- Wiszecki G. And W.S.Stiles, Color Science, Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae, 2nd Ed. Wiley, New York 1982
- Sève R. .- Physique de la couleur. Masson. Paris (1996)
- Echávarri J.F., Ayala F. et Negueruela A.I. .-Influence du pas de mesure dans le calcul des coordonnées de couleur du vin. Bulletin de l'OIV 831-832, 370-378 (2000)
- I.R.A.N.O.R . Magnitudes Colorimetricas. Norma UNE 72-031-83
- Bertrand A.- Mesure de la couleur. F.V. 1014 2311/190196
- Fernández, J.I.; Carcelén, J.C.; Martínez, A. III Congreso Nacional De Enologos, 1.997. Caracteristicas cromaticas de vinos rosados y tintos de la cosecha de 1996 en la region de murcia
- Cagnaso E..- Metodi Oggettivi per la definizione del colore del vino. Quaderni della Scuoladi Specializzazione in Scienze Viticole ed Enologiche. Universidad di Torino. 1997
- Ortega A.P., Garcia M.E., Hidalgo J., Tienda P., Serrano J. ± 1995- Identificacion y Normalizacion de los colores del vino. Carta de colores. Atti XXI Congreso Mundial de la Viña y el Vino, Punta del Este. ROU 378-391
- Iñiguez M., Rosales A., Ayala R., Puras P., Ortega A.P.- 1995 - La cata de color y los parametros CIELab, caso de los vinos tintos de Rioja. Atti XXI Congreso Mundial de la Viña y el Vino, Punta del Este.ROU 392-411
- Billmeyer, F.W. jr. and M. Saltzman: Principles of Color. Technology, 2. Auflage, New York; J. Wiley and Sons, 1981.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

В формальном смысле трихроматические компоненты X, Y, Z цветового стимула являются результатом интеграции во всем видимом диапазоне спектра функций

полученным путем умножения относительной спектральной характеристики цветового стимула на колориметрические характеристики эталонного наблюдателя. Данные характеристики всегда определяются экспериментальным путем. Поэтому невозможно вычислить трихроматические компоненты непосредственно путем интегрирования. Следовательно, приблизительные значения определяются путем замены этих интегралов суммированием относительно законченных интервалов длин волн.

$$X = K\sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \overline{X}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)}$$

$$Y = K\sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \overline{Y}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)}$$

$$Z = K\sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \overline{Z}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)}$$

$$K = 100 \Big/ \sum_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \overline{Y}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)}$$

$T_{(\lambda)}$ – измерение коэффициента светопропускания вина, измеренное по длине волны λ на расстоянии 1 см относительно оптической толщины.

$\Delta_{(\lambda)}$ – интервал между значениями λ, при которых измеряется $T_{(\lambda)}$.

$S_{(\lambda)}$ – коэффициенты, являющиеся функцией λ и прозрачности (Таблица 1).

$\overline{X}10_{(\lambda)}; \overline{Y}10_{(\lambda)}; \overline{Z}10_{(\lambda)}$: коэффициенты, которые зависят от λ и от наблюдателя. (Таблица 1)

Значения Xn, Yn и Zn представляют собой значения эталонного светорассеивающего устройства при определенном освещении и заданном эталонном наблюдателе. В данном случае освещенность D65, а наблюдатель находится выше 4 градусов. Xn = 94.825; Y_n = 100; Zn = 107.381

Данное примерно однородное пространство происходит из пространства CIEYxy, в котором определены трихроматические компоненты X, Y, Z.

Координаты L*, a* и b* рассчитываются на основе значений трихроматических компонентов X, Y, Z, с использованием следующих формул:

L* = 116 $(Y / Y_n)^{1/3}$ – 16 где Y/Yn > 0.008856

L* = 903.3 (Y / Y_n) где Y / Y_n < ó = 0.008856

a* = 500 [$f(X / X_n) - f(Y / Y_n)$]

b* = 200 [$f(Y / Y_n) - f(Z / Z_n)$]

$f(X / X_n) = (X / X_n)^{1/3}$ где $(X / X_n) > 0.008856$

$f(X / X_n) = 7.787 (X / X_n) + 16 / 166$ где $(X / X_n) < ó = 0.008856$

$f(Y / Y_n) = (Y / Y_n)^{1/3}$ где $(Y / Y_n) > 0.008856$

$f(Y / Y_n) = 7.787 (Y / Y_n) + 16 / 116$ где $(Y / Y_n) < ó = 0.008856$

$f(Z / Z_n) = (Z / Z_n)^{1/3}$ где $(Z / Z_n) > 0.008856$

$f(Z / Z_n) = 7.787 (Z / Z_n) + 16 / 116$ где $(Z / Z_n) < ó = 0.008856$

Общая колориметрическая разница между двумя цветами определяется по шкале CIELAB

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

В пространстве CIELAB выражаются не только общие вариации цвета, но и отношения к одному или нескольким параметрам L*, a* и b*. Это может быть использовано для определения новых параметров и соотнесения их с характеристиками зрительных ощущений.

Светлота, связанная со способностью вина пропускать световые лучи, непосредственно представлена значением L *.

Насыщенность: $C^* = (a^{*\,2} + b^{*\,2})^{\,1/2}$ определяет цвет.

Угол наклона оттенка: $H^* = tg^{-1} (b^*/a^*)$ (выраженный в градусах).

Разница в оттенках: $\Delta H^* = [(\Delta E^*)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*)^2]^{1/2}$

Для двух неопределенных цветов ΔC^* представляет собой разницу в цветности, ΔL^* - разницу в светлоте, а ΔE^* - общую вариацию цвета. Таким образом, мы имеем:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta C^*)^2 + (\Delta H^*)^2]^{1/2}$$

Таблица 1.

Длина волны (λ) нм.	$S_{(\lambda)}$	$\overline{X}_{10(\lambda)}$	$\overline{Y}_{10(\lambda)}$	$\overline{Z}_{10(\lambda)}$
380	50.0	0.0002	0.0000	0.0007
385	52.3	0.0007	0.0001	0.0029
390	54.6	0.0024	0.0003	0.0105
395	68.7	0.0072	0.0008	0.0323
400	82.8	0.0191	0.0020	0.0860
405	87.1	0.0434	0.0045	0.1971
410	91.5	0.0847	0.0088	0.3894
415	92.5	0.1406	0.0145	0.6568
420	93.4	0.2045	0.0214	0.9725
425	90.1	0.2647	0.0295	1.2825
430	86.7	0.3147	0.0387	1.5535
435	95.8	0.3577	0.0496	1.7985
440	104.9	0.3837	0.0621	1.9673
445	110.9	0.3867	0.0747	2.0273
450	117.0	0.3707	0.0895	1.9948
455	117.4	0.3430	0.1063	1.9007
460	117.8	0.3023	0.1282	1.7454
465	116.3	0.2541	0.1528	1.5549
470	114.9	0.1956	0.1852	1.3176
475	115.4	0.1323	0.2199	1.0302
480	115.9	0.0805	0.2536	0.7721
485	112.4	0.0411	0.2977	0.5701
490	108.8	0.0162	0.3391	0.4153
495	109.1	0.0051	0.3954	0.3024
500	109.4	0.0038	0.4608	0.2185
505	108.6	0.0154	0.5314	0.1592
510	107.8	0.0375	0.6067	0.1120
515	106.3	0.0714	0.6857	0.0822
520	104.8	0.1177	0.7618	0.0607
525	106.2	0.1730	0.8233	0.0431
530	107.7	0.2365	0.8752	0.0305
535	106.0	0.3042	0.9238	0.0206
540	104.4	0.3768	0.9620	0.0137
545	104.2	0.4516	0.9822	0.0079
550	104.0	0.5298	0.9918	0.0040
555	102.0	0.6161	0.9991	0.0011
560	100.0	0.7052	0.9973	0.0000
565	98.2	0.7938	0.9824	0.0000

570	96.3	0.8787	0.9556	0.0000
575	96.1	0.9512	0.9152	0.0000
580	95.8	1.0142	0.8689	0.0000
585	92.2	1.0743	0.8256	0.0000
590	88.7	1.1185	0.7774	0.0000
595	89.3	1.1343	0.7204	0.0000
600	90.0	1.1240	0.6583	0.0000
605	89.8	1.0891	0.5939	0.0000
610	89.6	1.0305	0.5280	0.0000
615	88.6	0.9507	0.4618	0.0000
620	87.7	0.8563	0.3981	0.0000
625	85.5	0.7549	0.3396	0.0000
630	83.3	0.6475	0.2835	0.0000
635	83.5	0.5351	0.2283	0.0000
640	83.7	0.4316	0.1798	0.0000
645	81.9	0.3437	0.1402	0.0000
650	80.0	0.2683	0.1076	0.0000
655	80.1	0.2043	0.0812	0.0000
660	80.2	0.1526	0.0603	0.0000
665	81.2	0.1122	0.0441	0.0000
670	82.3	0.0813	0.0318	0.0000
675	80.3	0.0579	0.0226	0.0000
680	78.3	0.0409	0.0159	0.0000
685	74.0	0.0286	0.0111	0.0000
690	69.7	0.0199	0.0077	0.0000
695	70.7	0.0138	0.0054	0.0000
700	71.6	0.0096	0.0037	0.0000
705	73.0	0.0066	0.0026	0.0000
710	74.3	0.0046	0.0018	0.0000
715	68.0	0.0031	0.0012	0.0000
720	61.6	0.0022	0.0008	0.0000
725	65.7	0.0015	0.0006	0.0000
730	69.9	0.0010	0.0004	0.0000
735	72.5	0.0007	0.0003	0.0000
740	75.1	0.0005	0.0002	0.0000
745	69.3	0.0004	0.0001	0.0000
750	63.6	0.0003	0.0001	0.0000
755	55.0	0.0002	0.0001	0.0000
760	46.4	0.0001	0.0000	0.0000
765	56.6	0.0001	0.0000	0.0000
770	66.8	0.0001	0.0000	0.0000
775	65.1	0.0000	0.0000	0.0000
780	63.4	0.0000	0.0000	0.0000

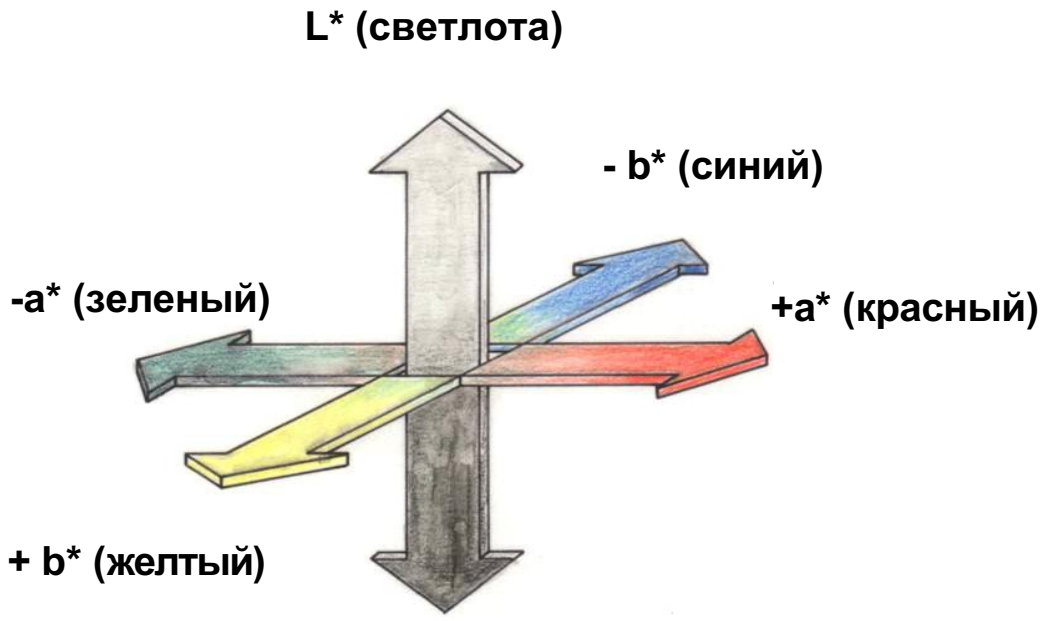


Рисунок 1. Диаграмма колориметрических координат по данным Международной комиссии по освещению (CIE, 1976)

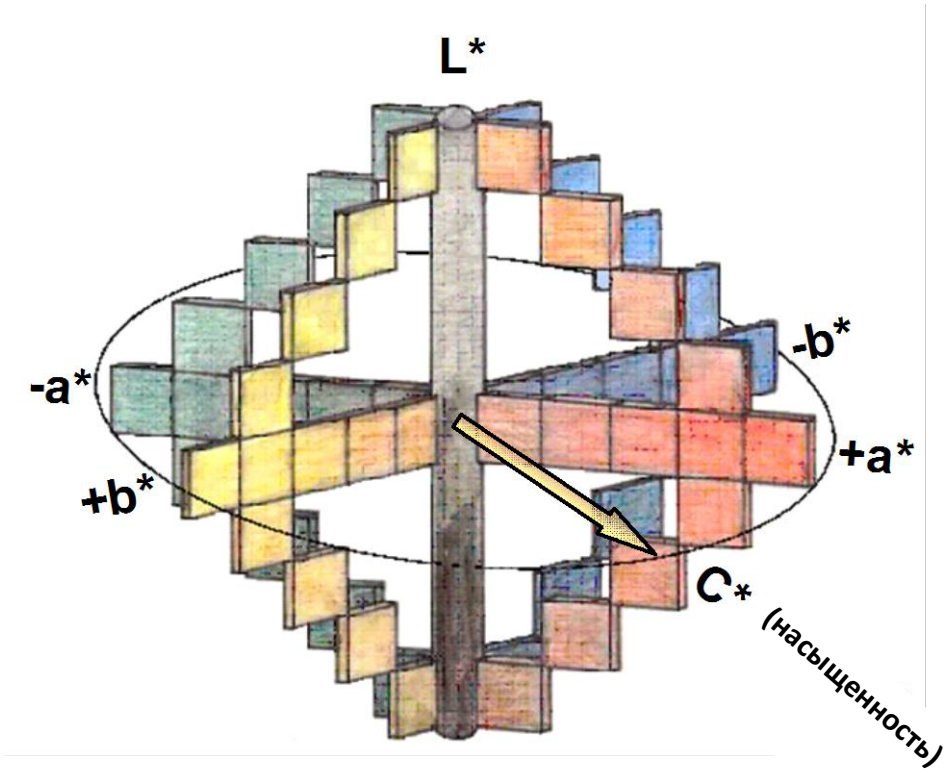


Рисунок 2. Цветовое пространство CIELab, основанное на последовательном или непрерывном декартовом отображении по 3 ортогональным осям L^*, a^* y b^*

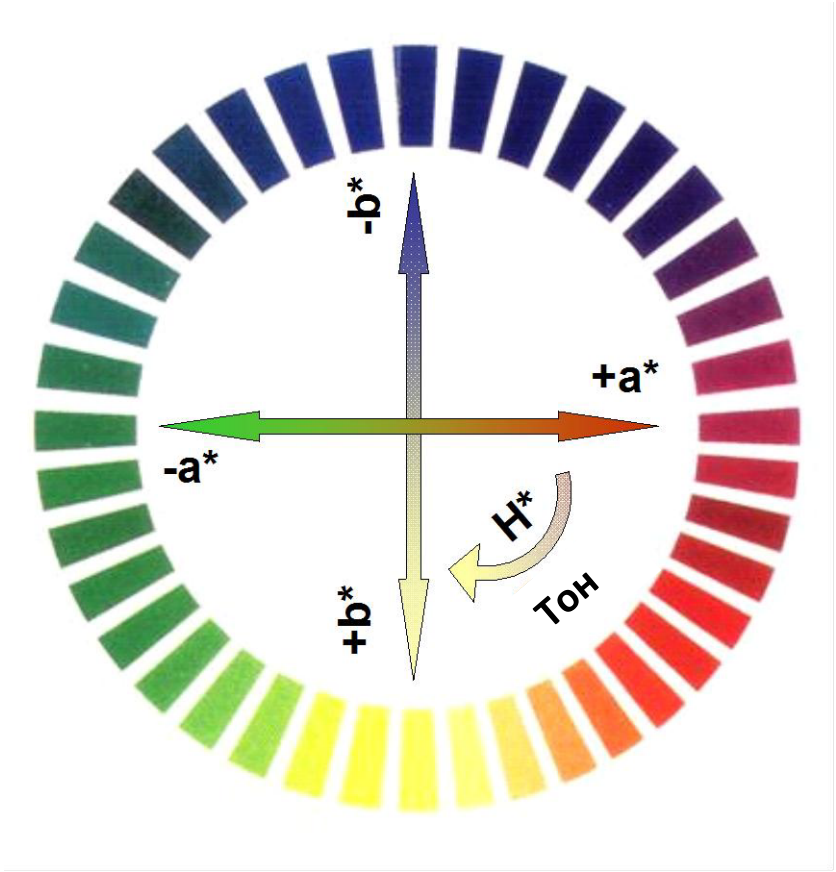


Рисунок 3. Последовательная диаграмма и/или продолжение колориметрических координат a и b и производной величины, например тона (H*)

Пример: Молодое красное вино

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ:

1. Тристимулус	Значения	2. Координаты	CIELab
X = 12,31 Y = 60,03 Z = 10,24	→	a* = 55,08 b* = 36,10 L* = 29,20	

ГРАФИЧЕСКОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ И ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ:

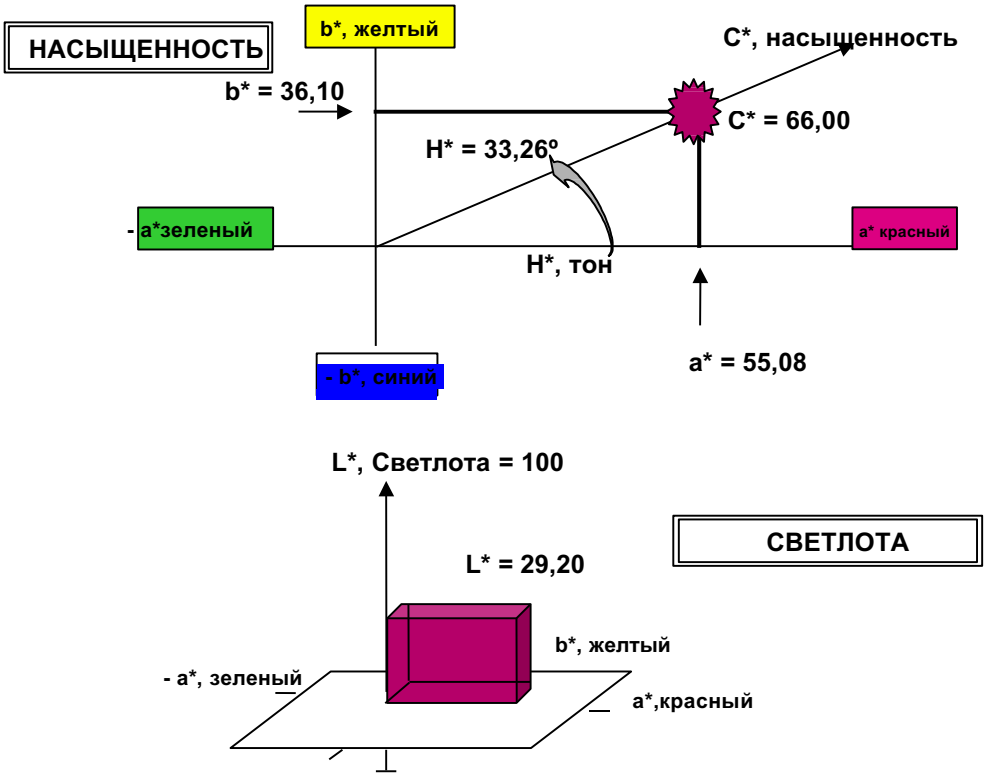


Рисунок 4. Отображение цвета молодого красного вина, использованного в качестве примера в главе 1.8 (показано на трехмерной диаграмме CIELab).

Метод OIV-MA-AS2-12 Метод II типа

Метод определения соотношения изотопов $^{18}O/^{16}O$ воды в винах и сусле (Резолюция OIV-Oeno 353/2009)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод описывает определение изотопного соотношения $^{18}O/^{16}O$ воды в вине и сусле после уравновешивания с CO2 с применением изотопного соотношения масс-спектрометрии (IRMS).

2. ЭТАЛОННЫЕ НОРМЫ

ISO 5725:1994: Точность (правильность и прецизионность) методов измерения и результатов является основным методом определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.

V-SMOW: Венский стандарт среднего уровня воды в океане (Vienna-Standard Mean Ocean Water) ($^{18}O/^{16}O = R_{V\text{-}SMOW} = 0.0020052$)

GISP Осадки ледяного щита Гренландии (Greenland Ice Sheet Precipitation)

SLAP Стандартные слабые Антарктические осадки (Standard Light Antarctic Precipitation)

3. Определения

$^{18}O/^{16}O$ Изотопное отношение кислорода 18 к кислороду 16 для данного образца

$\delta^{18}O_{V-SMOW}$ Относительная шкала для выражения отношения изотопов кислорода 18 к кислороду 16 для данного образца. $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ рассчитывается с использованием следующего уравнения:

$$\delta^{18}O_{V-SMOW} = \left[\frac{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{\text{образец}} - \left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{\text{стандарт}}}{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{\text{стандарт}}} \right] \times 1000[‰]$$

использование V-SMOW в качестве стандарта и точки отсчета для относительной шкалы δ

BCR	Справочное бюро Европейского сообщества
IAEA	Международное агентство по атомной энергии (Вена, Австрия)
IRMM	Институт стандартных материалов и измерений
IRMS	Масс-спектрометрия изотопного соотношения
m/z	Отношение массы к заряду
NIST	Национальный институт стандартов и технологий
RM	Эталонный материал

4. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Описанный далее метод основан на изотопном уравновешивании воды в образцах вина или сусла со стандартным газом CO_2 в соответствии со следующей реакцией изотопного обмена:

$$C^{16}O_2 + H_2{}^{18}O \leftrightarrow C^{16}O^{18}O + H_2{}^{16}O$$

После уравновешивания в газовой фазе диоксид углерода используется для анализа с помощью масс-спектрометрии с изотопным соотношением (IRMS), где для CO_2, полученного в результате уравновешивания, определяется изотопное соотношение $^{18}O/^{16}O$.

5. РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Сырье и расходные материалы зависят от используемого метода (см. главу 6). Обычно используемые системы основаны на уравновешивании воды в вине или сусле с CO2.
Могут быть использованы следующие справочные материалы, рабочие стандарты и расходные материалы.

5.1 Справочные материалы

Наименование	разработан	$\delta^{18}O$ vs V-SMOW
V-SMOW, RM 8535	IAEA / NIST	0 ‰
BCR-659	IRMM	-7.18 ‰
GISP, RM 8536	IAEA / NIST	-24.78 ‰
SLAP, RM 8537	IAEA / NIST	-55.5 ‰

5.2 Рабочие стандарты
5.2.1 Двуокись углерода в качестве вспомогательного эталонного газа для измерений (CAS 00124-38-9).
5.2.2 Двуокись углерода, используемая для уравновешивания (в зависимости от прибора это может быть тот же газ, что и в 5.2.1, или в системах непрерывного потока могут также использоваться баллоны с газовой смесью гелий - двуокись углерода).
5.2.3. Рабочие стандарты с калиброванными значениями $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$, сопоставимыми с международными стандартными образцами.

5.3 Расходные материалы
Гелий для анализа (CAS № 07440-59-7)

6. АППАРАТУРА

6.1 Масс-спектрометрия изотопного соотношения (IRMS)
Масс-спектрометр изотопного соотношения (IRMS) позволяет определить относительное содержание ^{18}O в природном CO_2 с точностью до 0.05 ‰. Внутренняя точность здесь определяется как разница между двумя измерениями одного и того же образца CO_2.
Масс-спектрометр, используемый для определения изотопного состава CO_2, обычно оснащен тройным коллектором для одновременного измерения следующих ионных токов:

- m/z = 44 ($^{12}C^{16}O^{16}O$)
- m/z = 45 ($^{13}C^{16}O^{16}O$ и $^{12}C^{17}O^{16}O$)
- m/z = 46 ($^{12}C^{16}O^{18}O$, $^{12}C^{17}O^{17}O$ и $^{13}C^{17}O^{16}O$)

Посредством измерения соответствующих интенсивностей изотопное отношение $^{18}O^{16}O$ определяется из отношения интенсивностей m/z = 46 и m/z = 44 после внесения поправок на изобарические цепочки ($^{12}C^{17}O^{17}O$ и $^{12}C^{17}O^{16}O$), влияние которых может быть рассчитано из фактической интенсивности, наблюдаемой для m/z = 45, и обычных изотопных расходов для ^{13}C and ^{17}O в природе.
Масс-спектрометрия соотношения изотопов должна быть оснащена:
- или системой двойного ввода для попеременного измерения неизвестного образца и эталонного стандарта.
- или системой непрерывного потока, которая количественно переносит CO_2 из пробирок с образцами после уравновешивания, а также стандартный газ CO_2 в масс-спектрометр.

6.2 Оборудование и материалы
Все используемое оборудование и материалы должны соответствовать заявленным требованиям используемого метода / аппаратуры (как указано производителем). Однако все оборудование и материалы могут быть заменены изделиями с аналогичными характеристиками.
6.2.1 Пробирки с септами, подходящими для используемой системы
6.2.2 Волюметрические пипетки с соответствующими наконечниками
6.2.3 Система с контролем температуры для проведения уравновешивания при постоянной температуре, обычно в пределах ±1 °C
6.2.4 Вакуумный насос (по требованию используемой системы)
6.2.5 Автосамплер (по требованию используемой системы)
6.2.6 Шприцы для отбора проб (по требованию используемой системы)
6.2.7 Колонка ГХ для отделения CO_2 от других элементарных газов (по требованию используемой системы)
6.2.8 Устройство для удаления воды (например, криоловушка, селективные проницаемые мембраны)

7. ОТБОР ПРОБ

Образцы вина и сусла, а также эталонные материалы используются для анализа без предварительной обработки. В случае возможной ферментации образца следует добавить бензойную кислоту (или другой продукт для предотвращения ферментации) или отфильтровать с помощью фильтра с диаметром пор 0,22 мкм.

Предпочтительно, чтобы эталонные материалы, используемые для калибровки и коррекции сдвига, были размещены в начале и в конце последовательности и вставлены через каждые десять проб.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Последующие описания относятся к процедурам, обычно используемым для определения изотопных соотношений $^{18}O^{16}O$ посредством уравновешивания воды с рабочим стандартом CO_2 и последующего измерения методом IRMS. Эти процедуры могут быть изменены в зависимости от изменений в оборудовании и приборах, предоставляемых производителями, поскольку существуют различные виды устройств для уравновешивания, подразумевающие различные условия работы. Две основные технические процедуры могут быть использованы для введения CO_2 в IRMS либо через систему двойного впуска, либо с помощью системы непрерывного потока. Описание всех указанных технических систем и соответствующих условий эксплуатации не представляется возможным.

Примечание: все приведенные значения объемов, температур, давлений и периодов времени являются носят лишь ориентировочный характер. Соответствующие значения должны быть получены из спецификаций, предоставленных производителем, и/или определены экспериментально.

8.1 Ручное уравновешивание

В колбу с помощью пипетки переносится определенный объем образца/стандарта. Затем колба плотно прикрепляется к коллектору. Каждый коллектор охлаждается до температуры ниже – 80 °C для глубокой заморозки образцов (коллекторы, оснащенные трубками с капиллярным отверстием, не требуют этого этапа заморозки). Затем вся система подвергается вакуумированию. После достижения стабильного вакуума газообразному рабочему стандарту CO2 разрешается расширяться в различных колбах. Для процесса уравновешивания каждый коллектор помещают в водяную баню с регулируемой температурой, обычно при 25°C (± 1°C) на 12 часов (на ночь). Очень важно, чтобы температура водяной бани поддерживалась постоянной и однородной. После завершения процесса уравновешивания полученный CO_2 переносится из колб в сильфон системы двойного впуска со стороны образца. Измерения проводятся путем многократного сравнения соотношения CO_2, содержащегося в образце и стандарте (эталонный газ CO_2) в системе двойного впуска. Этот подход повторяется до тех пор, пока не будет измерена последняя проба в данной последовательности.

8.2 Использование автоматического уравновешивающего устройства

Определенный объем образца/стандарта переносится в пробирку с помощью пипетки.

Пробирки с образцами присоединяются к системе уравновешивания и охлаждаются до температуры ниже – 80 °C для глубокой заморозки образцов (системы, оснащенные трубками с капиллярным отверстием, не требуют этого этапа заморозки). Затем вся система подвергается вакуумированию.

После достижения стабильного вакуума газообразный рабочий стандарт CO_2 помещается в пробирки. Равновесие достигается при температуре как правило 22 ± 1 °C после минимального периода в 5 часов и при умеренном перемешивании (если доступно). Поскольку продолжительность процесса уравновешивания зависит от различных параметров (например, геометрии пробирки, температуры, применяемого перемешивания и т.д.), минимальное время установления равновесия должно быть определено экспериментально.

После завершения процесса равновесия полученный CO_2 переносится из пробирок в сильфон системы двойного впуска со стороны образца. Измерения проводятся путем многократного сравнения соотношения CO_2, содержащегося в образце и стандарте (эталонный стандартный газ CO_2) в системе двойного впуска. Этот подход повторяется до тех пор, пока не будет измерена последняя проба в данной последовательности.

8.3 Ручная подготовка, ручное и автоматическое уравновешивание и анализ с помощью IRMS с двойным входом

Определенный объем образца/стандарта (например, 200 мкл) вводят во флакон с помощью пипетки. Затем открытые флаконы помещают в закрытую камеру, заполненную CO_2, используемым для уравновешивания (5.2.2). После нескольких продувок для удаления любых следов воздуха флаконы закрывают и затем помещают на термостатированную пластину устройства для смены образцов. Равновесие достигается по меньшей мере через 8 часов при температуре 40°C. Как только процесс уравновешивания завершен, полученный CO_2 высушивается, а затем переносится на сторону образца системы ввода с двойным входом. Измерения выполняются путем многократного сравнения соотношений CO_2, содержащегося на стороне образца, и стандартной стороны (эталонный стандартный газ CO_2) двойного впуска. Этот подход повторяется до тех пор, пока не будет измерен последний образец последовательности.

8.4 Использование автоматического уравновешивающего устройства, соединенного с системой непрерывного потока

Определенный объем образца/стандарта переносится в пробирку с помощью пипетки.
Пробирки с образцами помещаются в термостатируемую ванночку.
С помощью газового шприца флаконы промываются смесью He и CO_2. CO_2 остается в головном пространстве флаконов для установления равновесия.
Равновесие достигается при температуре обычно 30 ± 1 °C после минимального периода в 18 часов.
После завершения процесса уравновещивания полученный CO_2 передается с помощью системы непрерывного потока в источник ионов масс-спектрометра.
Эталонный газ CO_2 также вводится в IRMS с помощью системы непрерывного потока. Измерения проводятся в соответствии с определенным протоколом для каждого вида оборудования.

9. РАСЧЕТЫ

Интенсивность для m/z = 44, 45, 46 регистрируется для каждого образца и эталонных материалов, проанализированных в партии измерений. Затем изотопные соотношения $^{18}O^{16}O$ рассчитываются компьютером и программным обеспечением прибора IRMS в соответствии с принципами, описанными в разделе 6.1. На практике изотопные отношения $^{18}O^{16}O$ измеряются по рабочему эталону, предварительно откалиброванному по V-SMOW. В процессе измерений на линии могут возникать небольшие отклонения из-за изменений в инструментальных условиях.

В этом случае $\delta^{18}O$ образцов должно быть скорректировано в соответствии с разницей в значении $\delta^{18}O$ рабочего стандарта и его заданного значения, которое было предварительно откалибровано по V-SMOW. Между двумя измерениями рабочего стандарта есть вариация – это поправка, применяемая к результатам пробы, которые можно считать линейными. Рабочий стандарт должен быть измерен в начале и в конце всех серий проб. Поэтому для каждого образца можно рассчитать поправку, используя линейную интерполяцию между двумя значениями (разница между установленным значением рабочего стандарта и измерениями полученных значений).

Окончательные результаты представлены в виде относительного значения $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$, выраженные в значениях ‰$\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$, и рассчитываются по следующему уравнению:

$$\delta^{18}O_{V-SMOW} = \left[\frac{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{sample} - \left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{V-SMOW}}{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{V-SMOW}} \right] \times 1000 \ [‰]$$

Значение $\delta^{18}O$, приведенное в соответствие со шкалой V-SMOW/SLAP, рассчитывается с помощью следующего уравнения:

$$\delta^{18}O_{V-SMOW/SLAP} = \left[\frac{\delta^{18}O_{sample} - \delta^{18}O_{V-SMOW}}{\delta^{18}O_{V-SMOW} - \delta^{18}O_{SLAP}} \right] \times 55.5 \ [‰]$$

Значение $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$, принятое для SLAP, равно V-SMOW/SLAP – 55.5‰ (см. также 5.1).

10. Прецизионность

Повторяемость (r) равна 0.24 ‰.
Воспроизводимость (R) равна 0.50 ‰.

Краткое изложение статистических результатов

	Общее среднее значение (‰)		Стандартное отклонение повторяемости (‰) s_r		Повторяемость (‰) r		Стандартное отклонение воспроизводимости (‰) s_R		Воспроизводимость (‰) R
Вода									
Образец 1	-8.20		0.068		0.19		0.171		0.48
Образец 2	-8.22		0.096		0.27		0.136		0.38
Вино N° 1									
Образец 5	6.87		0.098		0.27		0.220		0.62
Образец 8	6.02		0.074		0.21		0.167		0.47
Образец 9	5.19		0.094		0.26		0.194		0.54
Образец 4	3.59		0.106		0.30		0.205		0.57
Вино N° 2									
Образец 3	-1.54		0.065		0.18		0.165		0.46
Образец 6	-1.79		0.078		0.22		0.141		0.40
Образец 7	-2.04		0.089		0.25		0.173		0.49
Образец 10	-2.61		0.103		0.29		0.200		0.56

11. МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Bulletin de I'O.I.V. Janvier-février 1997, 791-792, p. 53 - 65.

12. БИБЛИОГРАФИЯ

[1] Allison, C.E., Francey, R.J. and Meijer., H.A., (1995) Recommendations for the Reporting of Stable Isotopes Measurements of carbon and oxygen. Proceedings of a consultants meeting held in Vienna, 1 - 3. Dec. 1993, *IAEA-TECDOC-825*, 155-162, Vienna, Austria.

[2] Baertschi, P., (1976) Absolute ^{18}O Content of Standard Mean Ocean Water. *Earth and Planetary Science Letters*, 31, 341-344.

[3] Breas, O,. Reniero, F. and Serrini, G., (1994) Isotope Ratio Mass Spectrometry: Analysis of wines from different European Countries. *Rap. Comm. Mass Spectrom.,* 8*,* 967-987.

[4] Craig, H., (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim*. *Cosmochim. Acta*, 12, 133-149.

[5] Craig, H., (1961) Isotopic Variations in Meteoric Waters. *Science*, 133, 1702-1703.

[6] Craig, H., (1961) Standard for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters. *Science,* 133, 1833-1834.

[7] Coplen, T., (1988) Normalization of oxygen and hydrogen data. *Chemical Geol*ogy (Isotope Geoscience Section), 72, 293-297

[8] Coplen, T. and Hopple, J., (1995) Audit of V-SMOW distributed by the US National Institute of Standards and Technology. Proceedings of a consultants meeting held in Vienna, 1 - 3. Dec. 1993, *IAEA-TECDOC-825*, 35-38 IAEA, Vienna, Austria.

[9] Dunbar, J., (1982 Detection of added water and sugar in New Zealand commercial wines.). Elsevier Scientific Publishing Corp. Edts. Amsterdam, 1495-501.

[10] Epstein, S. and Mayeda, T. (1953) Variations of the $^{18}O/^{16}O$ ratio in natural waters. *Geochim*. *Cosmochim. Acta*, 4, 213 .

[11] Fôrstel, H. (1992) Projet de description d'une méthode : variation naturelle du rapport des isotopes 'O et O dans l'eau comme méthode d'analyse physique du vin en vue du contrôle de l'origine et de l'addition d'eau. *OIV, FV* n° 919, 1955/220792.

[12] Gonfiantini, R., (1978) Standards for stable isotope measurements in natural compounds. *Nature*, 271, 534-536.

[13] Gonfiantini, R., (1987) Report on an advisory group meeting on stable isotope reference samples for geochemical and hydrochemical investigations. IAEA, Vienna, Austria.

[14] Gonfiantini, R., Stichler, W. and Rozanski, K., (1995) Standards and Intercomparison Materials distributed by the IAEA for Stable Isotopes Measurements. Proceedings of a consultants meeting held in Vienna, 1 - 3. Dec. 1993, *IAEA-TECDOC-825*, 13-29 Vienna, Austria.

[15] Guidelines for Collaborative Study Procedures (1989) *J. Assoc. Off. Anal. Chem*., 72, 694-704.
[16] Martin, G.J., Zhang, B.L., Day, M. and Lees, M., (1993) Authentification des vins et des produits de la vigne par utilisation conjointe des analyses élémentaire et isotopique. *OIV, F.V.,* n°917, 1953/220792.
[17] Martin, G.J., Fôrstel, H. and Moussa, I. (1995) La recherche du mouillage des vins par analyse isotopique ^{2}H et ^{18}O. OIV, FVn° 1006, 2268/240595
[18] Martin, G.J. (1996) Recherche du mouillage des vins par la mesure de la teneur en 180 de l'eau des vins. 01V, FV n° 1018, 2325/300196.
[19] Martin, G.J. and Lees, M., (1997) Détection de l'enrichissement des vins par concentration des moûts au moyen de l'analyse isotopique ^{2}H et ^{18}O de l'eau des vins. OIV, FVn° 1019, 2326/300196.
[20] Moussa, I., (1992) Recherche du mouillage dans les vins par spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI). OIV, FVn°915, 1937/130592.
[21] Werner, R.A. and Brand, W., (2001) Reference Strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. Rap. Comm. Mass Spectrom., 15, 501-519.
[22] Zhang, B.L., Fourel, F., Naulet, N. and Martin, G.J., (1992) Influence de l'expérimentation et du traitement de l'échantillon sur la précision et la justesse des mesures des rapports isotopiques (D/H) et (lsO/160). OIV, F.V. n° 918, 1954/220792.

Метод OIV-MA-AS311-01A Метод IV типа

Редуцирующие вещества

(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Определение

Редуцирующие вещества включают все сахара, выполняющие кетоновые и альдегидные функции, и определяются по их восстановительному действию на щелочной раствор медной соли.

2. Сущность метода

Осветление

Вино обрабатывается одним из следующих реактивов:

- нейтральный ацетат свинца,
- ферроцианид цинка (II).

3. Осветление

Содержание сахара в жидкости, в которой необходимо определить сахар, должно находиться в пределах от 0,5 до 5 г/л.

Сухие вина не следует разбавлять во время осветления; сладкие вина следует разбавлять во время осветления, чтобы довести уровень сахара до пределов, установленных в следующей таблице.

Описание	Содержание сахара (г/л)	Плотность	Разбавление (%)
Сусла и мистели	> 125	> 1.038	1
Сладкие вина, крепленые или нет	25 до 125	1.005 до 1.038	4
Полусладкие вина	5 до 25	0.997 до 1.005	20
Сухие вина	< 5	< 0.997	Без разбавления

3.1. Осветление нейтральным ацетатом свинца.

3.1.1. Реактивы

- Нейтральный раствор ацетата свинца (приблизительно насыщенный)
  Нейтральный ацетат свинца, $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ .....250 г
  Кипяток……..……. 500 мл
  Перемешать до растворения.
- Раствор гидроксида натрия, 1 М
- Карбонат кальция.

3.1.2 Проведение исследования

- Сухие вина.

Помещают 50 мл вина в колбу объемом 100 мл; добавляют 0,5 (n - 0,5) мл раствора гидроксида натрия, 1 М (где n - объем раствора гидроксида натрия, 0,1 М, используемый для определения общей кислотности в 10 мл вина). Добавляют, помешивая, 2,5 мл насыщенного раствора ацетата свинца и 0,5 г карбоната кальция. Встряхивают несколько раз и дают раствору постоять не менее 15 минут. Доливают до метки водой. Фильтруют.

1 мл фильтрата соответствует 0,5 мл вина.

- Сусла, мистели, сладкие и полусладкие вина

В колбу объемом 100 мл помещают следующие объемы вина (или сусла, или мистеля), следующие разведения приведены для ориентира:

Пример 1 - Сусла и мистели: готовится 10% (об/об) раствор анализируемой жидкости и берется 10 мл разбавленного образца.

Пример 2 - Сладкие вина, крепленые или нет, плотностью от 1,005 до 1,038: готовится 20% (об/об) раствор анализируемой жидкости и берется 20 мл разбавленной пробы.

Пример 3 - Полусладкие вина, имеющие плотность от 0,997 до 1,005: берется 20 мл неразбавленного вина.

Добавляют 0,5 г карбоната кальция, около 60 мл воды и 0,5, 1 или 2 мл насыщенного раствора ацетата свинца. Перемешивают и оставляют стоять не менее чем на 15 минут, периодически помешивая. Доливают воду до метки. Фильтруют.

Примечание:

Пример 1: 1 мл фильтрата содержит 0,01 мл сусла или мистели.

Пример 2: 1 мл фильтрата содержит 0,04 мл сладкого вина.

Пример 3: 1 мл фильтрата содержит 0,20 мл полусладкого вина.

3.2. Осветление ферроцианидом цинка (II)

Данный процесс осветления следует использовать только для белых вин, слабоокрашенных сладких вин и сусел.

3.2.1 Реактивы

Раствор I: ферроцианид калия (II):

Ферроцианид калия (II), $K_4Fe(CN)_6$-$3H_2O$ ……150 г

Вода ……..до 1000 мл

Раствор II: сульфат цинка:

Сульфат цинка, $ZnSO_4$-$7H_4O$ …….300 г

Вода…….. до 1000 мл

3.2.2 Проведение исследования

В объемную колбу на 100 мл помещают следующие объемы вина (или сусла, или мистели), разбавления приведены для ориентира:

Пример 1 - Сусла и мистели. Готовится 10% (об/об) раствор жидкости, требующей анализа, берется 10 мл разбавленной пробы.

Пример 2 - Сладкие вина, крепленые или нет, плотностью от 1,005 до 1,038: готовится 20% (об/об) раствор анализируемой жидкости и берется 20 мл разбавленной пробы.

Пример 3 - Полусладкие вина, имеющие плотность при 20°C от 0,997 до 1,005: берется 20 мл неразбавленного вина.

Пример 4 - Сухие вина: берется 50 мл неразбавленного вина.

Добавляют 5 мл раствора I и 5 мл раствора II. Перемешивают. Доливают водой до метки. Фильтруют.

Примечание:

Пример 1: 1 мл фильтрата содержит 0,01 мл сусла или мистеля.

Пример 2: 1 мл фильтрата содержит 0,04 мл сладкого вина.

Пример 3: 1 мл фильтрата содержит 0,20 мл полусладкого вина.

Случай 4: 1 мл фильтрата содержит 0,50 мл сухого вина.

4. Определение содержания сахаров

4.1. Реактивы

- Щелочной раствор медной соли:

  Медный купорос, чистый, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ……..…25 г
  Лимонная кислота моногидрат ……50 г
  Кристаллический карбонат натрия, $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$……. 388 г
  Вода …… до 1000 мл

  Растворяют медный купорос в 100 мл воды, лимонную кислоту в 300 мл воды и карбонат натрия в 300-400 мл горячей воды. Смешивают растворы лимонной кислоты и карбоната натрия. Добавляют раствор медного купороса и доводят объем до одного литра.

- Раствор йодистого калия, 30% (*м/об*):

  Йодистый калий, KI…….. 30 г
  Вода ……до 100 мл

  Хранят в бутылке из цветного стекла.

- Серная кислота, 25% (*м/об*):

Концентрированная серная кислота, H_2SO_4, ρ_{20} = 1.84 г/мл …....25 г
Вода ……..... до 100 мл

Медленно добавляют кислоту к воде, дают остыть и доливают водой до 100 мл.

-Раствор крахмала, 5 г/л:

Смешивают 5 г крахмала с примерно 500 мл воды. Доводят до кипения, постоянно помешивая, кипятят в течение 10 минут. Добавляют 200 г хлорида натрия, NaCl. Дают остыть и затем разводят водой до одного литра.

-Раствор тиосульфата натрия, 0,1 М.

Инвертируют раствор сахара, 5 г/л, который будет применен для проверки метода определения.

Помещают в колбу объемном 200 мл следующее:

Сухая чистая сахароза……...4,75 г
Вода, приблизительно……. 100 мл
Конц. соляная кислота (ρ_{20}= 1.16 – 1.19 г/мл)…….5 мл

Нагревают колбу на водяной бане при температуре 60°C до тех пор, пока температура раствора не достигнет 50°C; затем держат колбу с раствором при 50°C в течение 15 минут. Дают колбе остыть естественным образом в течение 30 минут, а затем погружают ее в холодную водяную баню. Переливают раствор в однолитровую волюметрическую колбу и доводят объем до одного литра. Этот раствор хранится в течение месяца. Непосредственно перед использованием нейтрализуют исследуемый образец (раствор примерно 0,06 М кислоты) раствором гидроксида натрия.

4.2. *Проведение исследования*

Смешивают 25 мл щелочного раствора медной соли, 15 мл воды и 10 мл осветленного раствора в конической колбе емкостью 300 мл. Этот объем сахарного раствора не должен содержать более 60 мг инвертного сахара.

Добавляют несколько небольших фрагментов пемзы. Устанавливают на колбу конденсатор рефлюкса и доводят смесь до кипения в течение двух минут. Поддерживают кипение смеси ровно 10 минут.

Сразу же охлаждают колбу в холодной проточной воде. После полного охлаждения добавляют10 мл раствора йодистого калия, 30% (*м/об*); 25 мл серной кислоты, 25% (*м/об*), и 2 мл раствора крахмала.

Титруют раствором тиосульфата натрия, 0,1 М. Обозначают n как количество использованных мл. Также проводится холостое титрование, в котором 25 мл раствора сахара заменяют 25 мл дистиллированной воды. Обозначают n' как количество мл использованного тиосульфата натрия.

4.3. *Выражение результатов*

4.3.1 Расчеты

Количество сахара виде инвертного сахара, содержащегося в испытуемом образце, приведено в таблице ниже и зависит от количества (n' - n) мл использованного тиосульфата натрия.

Содержание сахара в вине должно быть выражено в граммах инвертного сахара на литр с точностью до одного десятичного знака, с учетом разбавления в процессе осветления и объема испытуемого образца.

Таблица зависимости между объемом раствора тиосульфата натрия: (n'-n) мл, и количеством редуцирующих сахаров в мг.

$Na_2S_2O_3$ (мл 0.1 M)	Редуцирующие сахара (мг)	Разница	$Na_2S_2O_3$ (мл 0.1 M)	Редуцирующие сахара (мг)	Разница
1	2.4	2.4	13	33.0	2.7
2	4.8	2.4	14	35.7	2.8
3	7.2	2.5	15	38.5	2.8
4	9.7	2.5	16	41.3	2.9
5	12.2	2.5	17	44.2	2.9
6	14.7	2.6	18	47.2	2.9
7	17.2	2.6	19	50.0	3.0
8	19.8	2.6	20	53.0	3.0
9	22.4	2.6	21	56.0	3.1
10	25.0	2.6	22	59.1	3.1
11	27.6	2.7	23	62.2	
12	30.3	2.7			

БИБЛИОГРАФИЯ

JAULMES P., *Analyses des vins,* 1951, 170, Montpellier.

JAULMES P., BRUN Mme S., ROQUES Mme J., *Trav. Soc. Pharm.,* 1963, **23,** 19.

SCHNEYDER J., VLECK G., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe und Wein,* 1961, sér. A, 135.

Метод OIV-AS311-01B

Редуцирующие сахара

(Резолюция Oeno 377/2009)

Сущность метода

Прояснение

После нейтрализации и удаления спирта вино пропускают через колонку с анионообменной смолой в ацетатной форме, затем осветляют колонку с анионообменной смолой в ацетатной форме, после чего проводится осветление с нейтральным ацетатом свинца.

ИСКЛЮЧЕН

Метод OIV-AS311-01C Метод II типа

Редуцирующие сахара

(Резолюция Oeno 377/2009)

Сущность метода

Терминология

Однократный метод: осветленное вино или сусло подвергается реакции с определенным количеством щелочного раствора медной соли, после чего избыток ионов меди определяется йодометрически.

ИСКЛЮЧЕН

Метод OIV-MA-AS312-03A Метод II типа

Метанол

(Резолюция Oeno 377/2009, в редакции OIV-OENO 480/2014)

1. Область применения

Данный метод применяется для определения метанола в вине при его концентрации от 50 до 500 мг/л.

2. Сущность метода

Метанол определяется в дистилляте, к которому добавляется внутренний стандарт, используя газовую хроматографию с пламенно-ионизационным детектором (ПИД).

3. Реактивы и материалы

3.1. Вода II типа, согласно стандарту ISO 3696

3.2. Этанол: отсутствие примесей ≥ 96 % (CAS № 64-17-5)

3.3. Водород: минимальные характеристики: 99.999%, отсутствие примесей (CAS № 1333-74-0)

3.4. Минимальные характеристики гелия: 99.999%, отсутствие примесей (CAS № 7440-59-7)

3.5. Метанол: отсутствие примесей ≥ 99 % (CAS № 67-56-1)

3.6. 4-метил-2-пентанол (внутренний стандарт): отсутствие примесей ≥ 98% (CAS № 108-11-2). Используется внутренний стандарт при валидации качества.

Примечание 1: Могут быть использованы другие внутренние стандарты, например:

- 3-пентанол: чистота ≥ 98% (CAS № 584-02-1)
- 4-метил-1-пентанол: чистота ≥ 98% (CAS № 626-89-1)
- Метил нонаноат: чистота ≥ 98% (CAS № 1731-84-6)

3.7. Эталонные материалы: к примеру, вина, полученные в результате сравнительных межлабораторных испытаний.

3.8. Подготовка рабочего раствора (в качестве примера):

3.8.1. Приблизительно 10% об/об водно-спиртовой смеси

Данная смесь должна иметь степень спирта, максимально близкую к показателям анализируемого вина. Наливают 100 мл этанола (3.2) в литровую калиброванную колбу (4.2), доводят до нужного объема деминерализованной водой (3.1) и перемешивают.

3.8.2. 10 г/л Раствор внутреннего стандарта

Используя аналитические весы (4.1), отмеряют примерно 1 г внутреннего стандарта (3.6) в 100 мл мерной колбе (4.3), содержащей около 60 мл 10% раствора этанола (3.8.1), чтобы минимизировать испарение внутреннего стандарта. Доводят до необходимого объема раствором этанола (3.8.1) и перемешивают.

3.8.3. Раствор внутреннего стандарта 1г/л

Добавляют 10 мл внутреннего стандарта 10 г/л (3.8.2) с помощью пипетки (4.8) и доводят до объема 100 мл (4.3), используя 10% об/об водно-спиртовую смесь (3.8.1).

3.8.4. Стоковый раствор метанола 5 г/л

Используя аналитические весы (4.1), взвешивают примерно 500 мг метанола (3.5) в 100 мл мерной колбе (4.3), содержащей около 60 мл 10% раствора этанола (3.8.1), чтобы минимизировать испарение метанола. Доводят до нужного объема раствором этанола (3.8.1) и перемешивают.

3.8.5. Рабочие калибровочные растворы

В качестве примера, метод для построения калибровочной кривой описан ниже. Каждый раствор следует готовить 10% водно-спиртовой смесью (3.8.1).

3.8.5.1. Стандартный раствор метанола 500 мг/л

Добавляют 10 мл стокового раствора 5 г/л (3.8.4) в 100 мл мерную колбу (4.3), используя пипетку (4.8) и довести до нужного объема 10% об/об раствором этанола (3.8.1).

3.8.5.1.1. Стандартный раствор метанола 250 мг/л

Добавляют 10 мл раствора метанола 500 мг/л (3.8.5.1) в 20 мл мерную колбу (4.5), используя пипетку (4.8), доводят до требуемого объема 10% об/об раствором этанола (3.8.1).

3.8.5.1.2. Стандартный раствор метанола 200 мг/л

Добавляют 20 мл раствора метанола 500 мг/л (3.8.5.1) в 50 мл мерную колбу (4.4), используя пипетку (4.7), доводят до требуемого объема 10% об/об раствором этанола (3.8.1).

3.8.5.1.3. Стандартный раствор метанола 150 мг/л

Добавляют 6 мл раствора метанола 500 мг/л (3.8.5.1) в 20 мл мерную колбу (4.5), используя пипетку (4.9), доводят до необходимого объема 10% об/об раствором этанола (3.8.1).

3.8.5.1.4. Стандартный раствор метанола 100 мг/л

Добавляют мл раствора метанола 500 мг/л (3.8.5.1) в 20 мл мерную колбу (4.5), используя пипетку (4.10), доводят до необходимого объема 10% об/об раствором этанола (3.8.1).

3.8.5.1.5. Стандартный раствор метанола 50 мг/л

Добавляют 2 мл раствора метанола (3.8.5.1) в 20 мл мерную колбу (4.5), используя пипетку (4.11), доводят до объема 10% об/об раствором этанола (3.8.1).

4. Аппаратура

4.1. Аналитические весы (1 мг осадка)

4.2. Мерные колбы класса А объемом 1 л

4.3. Мерные колбы класса А объемом 100 мл

4.4. Мерные колбы класса А объемом 50 мл

4.5. Мерные колбы класса А объемом 20 мл

4.6. Мерные колбы класса А объемом 10 мл

4.7. Пипетки с двумя отметками класса А 20 мл

4.8. Пипетки с двумя отметками класса А 10 мл

4.9. Пипетки с двумя отметками класса А 6 мл

4.10. Пипетки с двумя отметками класса А 4 мл

4.11. Пипетки с двумя отметками класса А 2 мл

4.12. Пипетки с двумя отметками класса А 1 мл или микропипетки 1 мл

4.13. Газовый хроматограф с температурным программированием пламенно-ионизационного детектора и системой обработки данных, способной вычислять площадь и высоту пиков.

4.14. Капиллярная колонка из плавленого кварца, с полярной неподвижной фазой типа Carbowax 20M (например):

- Chrompack CP-wax 57 CB, 50 м x 0.32 мм x 0.45 мкм
- DB-WAX 52, 30 м x 25 мм x 0.2 мкм

5. Подготовка проб

Игристые или молодые вина должны быть предварительно дегазированы, к примеру, взбалтыванием 200 мл вина в литровой колбе. Впоследствии, образцы дистиллируются согласно методу определения крепости алкоголя по объему (OIV-MA-AS312-01). В данном случае дистилляция может проводиться без добавления гидроксида кальция.

5.1. Добавление внутреннего стандарта примеру)

Наливают 10 мл дистиллята в мерную колбу объемом 10 мл (4.6), добавляют 1 мл (4.12) раствора внутреннего стандарта (3.8.3) и размешивают

6. Проведение исследования

Стандарты калибровки проводятся тем же самым образом, как и в образцах (пункт 5.1).

Рекомендовано вводить водно-спиртовой раствор (3.8.1) в начале последовательности, чтобы убедиться в отсутствии метанола.

6.1. Условия проведения исследования (согласно справочнику):

Газ-носитель: гелий или водород

Скорость потока газа-носителя: 7 мл/мин

Впрыск: разделение потока (соотношение: 7:50)

Объем впрыска: 1 или 2 мкл

Температура инжектора: 200-260 ºC

Датчик температуры: 220-300 ºC

Программа температуры: от 35 ºC (на 2 минуты) до 170 ºC, при 7.5 ºC/мин

7. Расчеты

Вычисляют концентрацию метанола (C_i), используя следующее уравнение:

$$C_i = \frac{C_p}{m}\left(\frac{A_i}{A_p} - b\right)$$

A_i – Область пика метанола

A_p – Область пика внутреннего стандарта

C_p – Концентрация внутреннего стандарта

m – Уклон калибровочной кривой

b – Y-точка пересечения калибровочной кривой

8. Выражение результатов

Концентрация метанола может быть выражена в мг/л или в мг/100 мл абсолютного спирта; в последнем случае следует определять содержание спирта по объему вина.

Примечание 2: мг/100 мл абсолютного спирта = мг/л x 10/содержание спирта по объему

9. Прецизионность

Данные международного межлабораторного тестирования изложены в Приложении A.

10. Контроль качества

Внутренний контроль качества может быть выполнен с помощью сертифицированных справочных материалов или характеристик вина, которые были определены на основе консенсуса (3.7). Они должны быть подготовлены так же, как и образцы (пункт 5). Рекомендовано участие в профессиональных тестированиях.

11. Отчет о результатах

Результаты выражены приблизительными числами (в соответствии с неопределенностью).

12. Библиография

Compendium of international methods of wine and must analysis. Method OIVMA-AS312-01 (Alcoholic strength).

Приложение А
Результаты статистики межлабораторного анализа

Разработка валидационного исследования

Валидационное исследование было проведено на 10 образцах: 2 образца белого вина, одно сухое и одно сладкое, 2 красных вина, одно из которых хранилось в дубовых бочках, и одно крепленое вино (портвейн), с применением двойного слепого анализа согласно рекомендациям МОВВ Приблизительная концентрация метанола представлена в таблице ниже.

Проба	Белое сухое вино	Белое сл. вино	Красное вино	Красное вино,выдержанное в дубовых бочках	Крепл.вино Портвейн
Метанол (мг/л)	50	150*	270	400*	120

(*) В этом случае, метанол был добавлен в вино, чтобы покрыть большую часть диапазона концентрации. Затем вино было гомогенизировано, стабилизировано и разлито в бутылки.

Лаборатории, принявшие участие:

Образцы были отправлены в 17 лабораторий разных стран.

Laboratorios Agroalimentarios, Madrid (Испания)

Estación de Viticultura y Enología de Galicia, EVEGA (Испания)

Estació de Viticultura i Enologia de Vilafranca del Penedès, (Испания)

Estación Enológica de Haro, La Rioja (Испания)

Estación de Viticultura y Enología de Galicia (Испания)

Lab. Bordeaux, Service Commun des Lab., Pessac (Франция)

Laboratoire d'Ile-de-France, Paris (Франция)

Laboratoires Inter Rhône (Франция)

Comité Interprof. du Vin de Champagne (CIVC) (Франция)

Bfr-Bundesinst. f. Risikobewertung (Германия)

Landesuntersuchungsamt Mainz (Германия)

Instituto Nacional de Vitivinicultura, Mendoza (Аргентина)

ALKO Inc., Alcohol Control Lab. (ACL) (Финляндия)

Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (Португалия)

Czech Agriculture and Food Inspection Authority (CAFIA), Brno (Чешская Республика)

National Food Safety Office, Directorate of Oenology and Alcoholic Beverages (NÉBIH BAII), Budapest (Венгрия)

Lehr- und Forschungszentrum, Klosterneuburg (Австрия)

Совместное исследование метанола

	Белое сухое		Белое сладкое		Красное вино		Красное вино, выдерж.в дубовых бочках		Портвейн	
Код лаборатории	A	G	B	H	C	I	D	J	E	K
A	39.99	38.13	127.42	136.25	144.80	145.71	496.53	513.00	192.13	219.39
B	41.20	40.90	157.60	160.50	150.40	146.90	484.90	477.80	222.40	219.60
C	36.80	35.60	133.50	129.20	119.10	134.10	454.10	478.40	197.00	174.80
D	36.00	39.60	**177.40**	**145.50**	160.80	138.00	**302.00**	**494.50**	216.10	248.50
E	**68.00**	**70.00**	163.00	169.00	178.00	177.00	503.00	495.50	225.00	227.00
F	37.00	37.10	148.30	148.20	143.40	142.40	484.10	474.00	206.30	206.90
G	41.40	42.30	152.60	152.40	149.70	150.50	489.60	491.10	216.60	217.20
H	36.80	32.40	140.80	129.10	128.00	137.70	440.60	429.30	187.50	192.80
I	42.90	43.30	153.50	155.50	139.70	147.40	468.30	456.10	225.30	225.60
J	40.90	40.60	155.50	154.60	148.50	149.10	496.40	499.80	217.10	217.00
K	39.30	36.20	**103.10**	**143.10**	131.90	115.90	**437.90**	**334.00**	156.10	172.60
L	35.00	39.00	164.00	167.00	157.00	160.00	492.00	508.00	249.00	220.00
M	43.60	43.40	157.30	154.90	155.50	158.90	506.80	496.10	217.70	219.50
N	34.20	33.60	126.50	125.70	125.90	133.60	429.10	429.00	192.10	188.90
O	34.00	35.70	149.00	154.80	144.20	141.80	482.80	473.60	210.40	218.10
P	44.70	43.70	151.60	146.90	140.70	147.60	451.20	472.80	205.40	205.80
Q	40.70	38.80	153.00	149.80	158.20	153.40	498.20	497.50	225.50	217.20

Примечание: Показатели, выделенные жирным шрифтом, соответствуют выбросам, отклоненным в соответствии с критериями Кохрана (выбросы дисперсии) и Граббса (средние выбросы).

Показатели	Белое сухое	Сладкое сухое	Красное	Красное дуб.	Портвейн
Количество лабораторий	16	15	17	15	17
Количество повторений	2	2	2	2	2
Минимум	32.40	125.70	115.90	429.00	156.10
Максимум	44.70	169.00	178.00	513.00	249.00
Дисперсия повторяемости s_r^2	2.2466	12.1330	39.0164	76.3567	105.3390
Межгрупповая дисперсия s_r^2	9.61893	146.39249	151.90249	535.61827	292.14282
Дисперсия воспроизводимости s_r^2	11.8655	158.5254	190.9189	611.9750	397.4819
Общие среднее значение	38.90	148.92	145.76	478.97	210.37
Стандартное отклонение повторяемости	1.50	3.48	6.25	8.74	10.26
Предел r	4.242	9.858	17.677	24.729	29.046
Повторяемость CV	3.9	2.3	4.3	1.8	4.9
Стандартное отклонение воспроизв.	3.44	12.59	13.82	24.74	19.94
Предел R	9.748	35.632	39.103	70.009	56.422
Воспроизводимость CV	8.9	8.5	9.5	5.2	9.5
Индекс Горвица RSDr	6.09	4.97	4.99	4.17	4.72
Индекс Горвица r	0.6	0.5	0.9	0.4	1.0
Индекс Горвица RSD	9.22	7.53	7.56	6.32	7.15
Индекс Горвица R	1.0	**1.1**	**1.3**	0.8	**1.3**

Повторяемость и воспроизводимость метода приняты согласно значениям индекса Горвица

Z-показатели, полученные участниками: из 85 Z-показателей 3 оказались неудовлетворительными и 4 под вопросом

	Z-показатели	Z-показатели	Z-показатели	Z-показатели	Z-показатели
Код лаборатории	Белое сухое вино	Белое сладкое вино	Красное вино	Красное вино, выдерж. в дуб. б.	Портвейн
A	0.05	-1.36	-0.04	1.04	-0.23
B	0.62	0.80	0.21	0.10	0.53
C	-0.78	-1.40	-1.39	-0.51	-1.23
D	-0.32	1.00	0.26	**-3.26**	1.10
E	**8.74**	1.36	**2.30**	0.81	0.78
F	-0.54	-0.05	-0.21	0.00	-0.19
G	0.86	0.28	0.31	0.46	0.33
H	-1.25	-1.11	-0.93	-1.78	-1.01
I	1.22	0.44	-0.16	-0.68	0.76
J	0.54	0.49	0.22	0.77	0.34
K	-0.33	**-2.05**	-1.58	**-3.76**	**-2.31**
L	-0.55	1.32	0.92	0.85	1.21
M	1.34	0.57	0.83	0.91	0.41
N	-1.45	-1.81	-1.16	**-2.02**	-1.00
O	-1.18	0.24	-0.20	-0.03	0.19
P	1.54	0.03	-0.12	-0.69	-0.24
Q	0.25	0.20	0.73	0.76	0.55

Метод OIV-MA-AS312-03B Метод IV типа

Метанол

(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Сущность метода

Винный дистиллят, разбавляют до 5% содержания этанола (об/об). Метанол окисляется до формальдегида (метиловый спирт) с помощью перманганата калия (подкисляется фосфорной кислотой). Количество формальдегида определяется по фиолетовому цвету при реакции хромотроповой кислоты в серной среде. Насыщенность цвета определяется спектрофотометрией при длине волны 575 нм.

2. Метод

2.1 *Реактивы*

2.1.1 Хромотроповая кислота

4,5-Дигидрокси-2,7-нафталиндисульфокислота, $C_{10}H_8O_8S_2 \cdot 2H_2O$, с молекулярной массой 356.34 г.

Белый или светло-коричневый порошок, растворяемый в воде. Также можно использовать динатриевую соль данной кислоты, которая образует желтую или светло коричневую субстанцию, растворимую в воде.

Очистка – Хромотроповая кислота должна быть чистой и давать незначительный цвет во время холостой пробы реактивов, приготовленных с ее добавлением. В противном случае ее можно очистить следующим образом. Растворяют 10 г хромотроповой кислоты или ее солей в 25 мл дистиллированной воды. Если соль была использована, добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты (ρ_{20} = 1.84 г/мл) чтобы высвободить кислоту. Добавляют 50 мл метанола, кипятят и процедить. Добавляют 100 мл изопропилового спирта, чтобы осадить кристаллы, кипятят и процеживают кристаллы при низкой температуре.

Реакция – При добавлении хлорида железа (1 капля) в 10 мл раствора, 0.1 г/л, он принимает зеленый цвет.

Проба на чувствительность – Разводят 0.5 мл формальдегида аналитического класса водой до 1 литра.
К 5 мл 0.05% раствора хромотроповой кислоты и 75% серной кислоты (об/об) добавляют 0.1 мл раствора формальдегида и нагревают до 70°C в течение 20 мин. Должен появиться фиолетовый цвет.

2.1.2 Добавляют раствор 0.05% хромотроповой кислоты, и раствор 75% сульфурной кислоты, (об/об).
Растворяют 50 мг хромотроповой кислоты (2.1.1) или ее натриевую соль в 35 мл дистиллированной воды. Остужают раствор ледяной водой и осторожно добавляют 75 мл концентрированной серной кислоты (ρ_{20}= 1.84 г/мл) небольшими порциями, все время помешивая. Раствор должен быть приготовлен сразу перед использованием.

2.1.3 Метанол, 5 г/л, стандартный раствор в спирте 5%, (об/об)

Чистый метанол (E_{760} = 64.7 ± 0.2)	0.5 г
Абсолютный спирт (без метанола)	50 мл
Дистиллированная вода ……..	1 литр

2.1.4 Разбавляющий раствор

Абсолютный спирт (без метанола)	50 мл
Дистиллированная вода……	1 литр

2.1.5 Раствор фосфорной кислоты, 50% (*м/об*)

2.1.6 Раствор перманганата калия, 5% (*м/об*)

2.1.7 Нейтральный раствор сульфата натрия, 2% (*м/об*)

Раствор быстро окисляется на воздухе. Определить точную крепость с помощью йодометрического титрования.

2.2 *Проведение исследования*

Растворяют винный дистиллят (см. главу *Крепость алкоголя*), чтобы сократить крепость алкоголя до 5%.

В пробирку с притертой стеклянной пробкой помещают 0.5 мл разбавленного дистиллята, добавляют 1 каплю 50% фосфорной кислоты, 2 капли 5% раствора перманганата калия, встряхивают и оставляют на 10 минут.

Обесцвечивают перманганат калия, добавив несколько капель, обычно 4, нейтрализованного 2% раствора сульфата натрия, (избегают любых превышений). Добавляют 5 мл 0.05% хромотроповой кислоты. Помещают на водяную баню при 70°C на 20 минут. Дают остыть.

Определяют оптическую плотность A_s, при длине волны 570 нм, значение нулевого коэффициента корректируется на контрольном образце, приготовленном с помощью 0.5 мл разбавленного раствора.

Построение калибровочной кривой

В серию 50 мл сферических колб помещают 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 мл метанола, 0.5 г/л, раствор 5% этанола. Данные растворы содержат 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мг метанола на литр.

Одновременно обрабатывают 0,5 мл разбавляющего раствора и 0.5 мл каждого стандартного раствора, используют аналогичный метод, чтобы довести винный дистиллят до 5% концентрации этанола.

Определяют оптическую плотность этих растворов при длине волны 570 нм при условиях, описанных выше.

Графическое представление оптической плотности стандартных растворов в зависимости от концентрации выражается прямой линией.

2.3 *Расчеты*

Определяют концентрацию метанола, выраженную в мг/л винного дистиллята, доведенного до крепости 5% об спирта, по отметке A_S на калибровочной линии. Выражают концентрацию в вине в мг/л, учитывая разбавление для снижения его титра до 5% об.

Метод OIV-MA-AS312-04 Метод IV типа

Глицерин и 2,3-Бутандиол

(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Сущность метода

Глицерин и 2,3-бутандиол окисляется йодной кислотой после обработки на колонке с аниообменной смолой для фиксации сахаров и большой пропорции маннитола и сорбитола. Продукт, полученный воздействием флороглюцинола на формальдегид (при оксилении глицерина), определяется колометрически при длине волны 480 нм. Продукт, полученный при воздействии раствора пиперидина и раствора нитроферрицианида натрия на этанол (при окислении 2,3-бутандиола), определяется колометрически при длине волны 570 нм.

2. Аппаратура

2.1 Стеклянная колонка 300 мм в длину и примерно 10-11 мм внутреннего диаметра, оснащенная краном

2.2 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения длин волн в пределах между 300 и 700 нм, и стеклянные ячейки с длиной оптического пути 1 см.

3. Реактивы

3.1 Глицерин, $C_3H_8O_3$

3.2 2,3-бутандиол, $C_4H_{10}O_2$

3.3 Сильноосновный анионит, например анионообменная смола Merck III или Amberlite IRA 400.

3.4 Поливинилполипирролидон (PVPP) (см. Международный Энологический Кодекс).

3.5 Йодная кислота, 0.1 М, в серной кислоте, 0.05 М.

Взвесить 10,696 г метапериодата натрия, $NaIO_4$, поместить в 500 мл мерную колбу, растворить в 50 мл серной кислоты, 0.5 М, и довести объем до 500 мл дистиллированной водой.

3.6 Йодная кислота, 0.05 М, в серной кислоте, 0.025 М.

3.7 Серная кислота, 0.5 М.

Вышеуказанный раствор (3.5) разбавляется 1 : 1 дистиллированной водой.

3.8 Раствор гидроксида натрия, 1 М.

3.9 Раствор гидроксида натрия, 5% (м/об).

3.10 Этанол, 96% (об/об).

3.11 Раствор флороглюцинола, 2% (м/об),приготовляемый ежедневно.

3.12 Раствор ацетата натрия, 27% (*м/об*), изготовленный на основе безводного ацетата натрия, CH_3COONa.

3.13 Раствор нитроферрицианида натрия, $Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$, 2% (*м/об*), приготовляемый ежедневно

3.14 Раствор пиперидина, $C_5H_{11}N$ 25% (*об/об*), приготовляемый ежедневно.

3.15 Стандартный раствор глицерина

Приготовляют раствор, содержащий 250 мг глицерина в 100 мл, и определяют содержание глицерина с помощью ферментативного или периодиметрического анализа (см. раздел 6). Приготовляют стандартный раствор глицерина следующим образом: отмеряют в 100 мл мерной колбе массу "*m*", соответствующую 250 мг чистого глицерина, довести до 100 мл, разбавив водой.

3.16 Стандартный раствор 2,3-бутандиола

Приготовляют раствор, содержащий 250 мг образца 2,3-бутандиола в 100 мл и определяют содержание 2,3-бутандиола при периодиметрическом анализе (см. раздел 6).

Приготовляют стандартный раствор 2,3-бутандиола, отмерив в 100 мл мерной колбе массу "*m*" соответствующую 250 мг чистого 2,3-бутандиола; разбавляют водой до 100 мл.

3.17 Щелочной раствор меди:

Раствор меди А

Сульфат меди, $CuSO_4.5H_20$	40 г
Серная кислота (r=1.84 г/мл)	2 мл

Довести до 1000 мл водой

Щелочной раствор винной кислоты В

Тетрагидрат тартрата калия-натрия $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$	200 г
Гидроксид натрия	150 г

Довести до 1000 мл водой

Раствор щелочной меди достигается смешиванием раствора А и В в равных пропорциях во время использования.

4. Проведение исследования

4.1 *Подготовка анионообменной колонки*

Анионообменная смола (Cl^-) должна храниться в колбе, заполненной декарбонизированной дистиллированной водой.

Добавляют 30 мл анионообменной смолы (3.3) в колонку (2.1), помещают заглушку из стекловаты на верхнюю часть колонки, чтобы не допустить контакта воздуха со смолой. Пропускают 150 мл 5% гидроксида натрия (3.9) через колонку со скоростью потока от 3.5 до 5 мл в минуту, затем пропускают то же количество декарбонизированной дистиллированной воды с той же скоростью

потока, пока элюент не станет нейтральным или слабощелочным к фенолфталеину, после чего смола готова к использованию.

Анионообменную смолу можно использовать только один раз. Ее можно восстановить, обработав 5% соляной кислотой в течение нескольких часов, а затем промыть водой до полного удаления хлорида. (Проверить на отсутствие хлорида)

4.2 *Подготовка пробы*

Образец вина разводится в пропорции 10/50.

В случае сильно окрашенных вин, сперва обесцвечивают ь с помощью ПВПП (3.4): помещают 10 мл вина в 50 мл мерную колбу, развести водой (20 мл) и добавить 300 мг ПВПП (3.4). Оставляют на 20 мин. Периодически помешивая, регулируют с помощью калибровочной метки и процедить через рифленый бумажный фильтр. Берут 10 мл разбавленного вина (обработанного или необработанного РВПП) и помещают на анионообменную колонку. Дают воде стечь по капле, при расходе не превышающем 2 мл в минуту. Когда уровень разбавленного вина превысит на 5-10 мм пробку из стекловаты, добавить декарбонизированную дистиллированную воду, чтобы достичь объема элюата в 100 мл, со скоростью 2-3 мл в минуту. Элюат не должен содержать сахар. Чтобы убедиться в этом, быстро кипетят 5 мл элюата и 5 мл щелочного медного раствора (3.17). В растворе не должно быть обесцвечивания или осадка.

4.3 *Определение глицерина*

4.3.1 Фотометрическое определение

Поместить в 100 мл конический сосуд с шлифованным горлышком:

10 мл элюата и постепенно добавить

10 мл дистиллированной воды и

10 мл раствора йодной кислоты, 0.05 М (3.6).

Осторожно перемешать; оставить ровно на 5 мин. для окисления. Добавить 10 мл гидроксида натрия, (3.8), и 5 мл 96% этанола (*об/об*) (3.10). Помешивать после добавления каждого элемента, затем добавить 10 мл раствора флороглюцинола (3.11)

Быстро смешать и переместить раствор в 1 см ячейку. Фиолетовый цвет проявляется очень быстро. Его насыщенность достигает максимума через 50-60 секунд, затем снижается. Отмечают максимальное поглощение. Измерение проводится при длине волны 480 нм, используя воздух в качестве эталона.

4.3.2 Построение калибровочной кривой

Отмерить пипеткой в 100 мл мерную колбу:

3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 и 8.0 мл стандартного раствора глицерина (3.15) и довести до необходимого объема дистиллированной водой.

Эти растворы взаимодействуют, согласно условиям в пункте 4.2, при следующих концентрациях:

3.75, 5.00, 6.25, 7.50, 8.75 и 10.00 г/л глицерина.

Приступить к определению, как описано в пункте 4.3.1, заменяя элюат тем же количеством каждого из стандартных растворов.

4.4 *Определение 2,3-бутандиола*

4.4.1 Фотометрическое определение

Поместить в 100 мл коническую колбу с притертой пробкой:

20 мл элюата и последовательно добавляют

5 мл раствора ацетата натрия (3.12) и

5 мл 0.1 М раствора йодной кислоты (3.5).

Перемешать, оставить ровно на 2 мин для окисления:

5 мл раствора нитроферрицианида натрия (3.13) и

5 мл раствора пиперидина (3.14).

Перемесить раствор в 1 см ячейку. Фиолетовый цвет проявляется очень быстро; его насыщенность достигает максимума через 30-40 сек, а затем уменьшается. Отметить максимальное поглощение. Измерения проводятся относительно воздушного слоя равной площади на длине волны 570 нм.

4.4.2 Подготовка калибровочной кривой

Поместить 10.0 мл стандартного раствора 2,3-бутандиола (3.16) в 100 мл мерную колбу и довести до метки дистиллированной водой. Из этого раствора приготовить стандартные растворы, помещая в мерные колбы вместимостью 100 мл:

2.0, 4.0, 6.0, 8.0 и 10.0 мл, каждый раз доводя до метки дистиллированной водой

Растворы смешиваются, согласно условиям в пункте 4.2 при следующих концентрациях: 0.25, 0.50, 0.74, 1.00 и 1.25 г/л 2,3-бутандиола.

Приступить к определению, как описано в пункте 4.4.1, заменив элюат тем же количеством стандартных растворов. Прямая линия калибровочного графика должна проходить через начало координат.

5. Расчеты и выражение результатов

5.1 *Глицерин*

5.1.1 Метод расчета

Определить содержание глицерина по калибровочной кривой. Результат выражается в г/л с точностью до одного знака после запятой.

5.1.2 Повторяемость

5.1.3 Воспроизводимость

5.2 *2,3-бутандиол*

5.2.1 Метод расчета

Прочитать содержание 2,3-бутандиола по калибровочной кривой.
Результат выражается в г\л с точностью до двух знаков после запятой.

5.2.2 Повторяемость

5.2.3 Воспроизводимость

6. Глицерин и 2,3-бутандиол методом периодического титрования

6.1 *Реактивы*

6.1.1 Раствор гидроксида натрия, 1 М.

6.1.2 Раствор серной кислоты, 0.5 М.

6.1.3 Раствор йодной кислоты, 0.025 М.

6.1.4 Раствор бикарбоната натрия, $NaHCO_3$, 8% (*м/об*).

6.1.5 Раствор арсената натрия, 0.025 М.

В 1000 мл мерной колбе растворить 2.473 г триоксида мышьяка, As_2O_3, в 30 мл 1 М гидроксида натрия (6.1.1) добавить 35 мл 0.5 М серной кислоты (6.1.2), и довести до метки дистиллированной водой.

6.1.6 Йодный раствор, 0.025 М.

6.1.7 Йодистый калий, 10% (*м/об*).

6.1.8 Крахмальный клейстер, 2% (*м/об*).

6.2 *Проведение исследования*

В коническую колбу объемом 300 мл добавить:
5 мл образец раствора глицерина (3.15)
45 мл дистиллированной воды
или
25 мл образца раствора 2,3-бутандиола (3.16)
25 мл дистиллированной воды

Добавить:
20 мл йодной кислоты, 0.025 М (6.1.3), оставить на 15 минут, время от времени взбалтывая
10-20 мл раствора бикарбоната натрия (6.1.4)
20 мл раствора мышьякового натрия (6.1.5)

Оставить на 15 минут, время от времени встряхивая и добавить:
5 мл раствора йодистого калия (6.1.7)
2 мл крахмального клейстера (6.1.8)

Титровать избыток арсинат натрия с 0.025 М йодным раствором (6.1.6).
В это же время подготовить холостое испытание, используя 50 мл дистиллированной воды с тем же количеством реактивов.

6.3 *Метод вычисления*

6.3.1 Глицерин

1 мл йодной кислоты, 0.025 M, окисляет 1.151 мг глицерина.
Содержание глицерина в г/л стандартного раствора глицерина

$$G = \frac{(X - B) \times 1{,}151}{a}$$

Процентное соотношение глицерина, используемого в стандартном растворе глицерина (3.15) составляет: $\frac{G}{2{,}5} \times 100$

X = мл йодного раствора, 0.025 M, используемый для стандартного раствора (3.15)
B = мл йодного раствора, 0.025 M, в холостом испытании
a = мл тестового раствора (3.15) (равен 5 мл)

6.3.2 2,3-Бутандиол

1 мл йодной кислоты, 0.025 M, окисляет 2.253 мг 2,3-бутандиола.

Содержание 2,3-бутандиола г/л в стандартном растворе 2,3-бутандиола (3.16) составляет:

$$BD = \frac{(X' - B') \times 2{,}253}{b}$$

Процентное соотношение 2,3-бутандиола, используемого в стандартном растворе 2,3-бутандиола (2.3) составляет:

$$\frac{BD}{2{,}5} \times 100$$

X' = mL

Йодный раствор, 0.025 M, используемый в стандартном растворе (3.16)
B' = мл йодного раствора, 0.025 M, используется в холостом испытании
b = мл тестового раствора (3.16) (равняется 25 мл)

BIBLIOGRAPHY

REBELEIN H., Z. *Lebensm. Unters. u. Forsch.,* 1957, **4**, 296, *F.V., O.I.V.*, n° 63.
TERCERO C., SANCHEZ O., *F.V., O.I.V.*, 1977, n° 651 et 1981, n° 731.

Метод OIV-MA-AS312-05 Метод IV типа

Глицерин

(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Сущность метода

Глицерокиназа (ГК) катализирует фосфорилирование глицерина до глицерол-3-фосфата с помощью аденозин-5'-трифосфата (АТФ) (1):

(1) $$\text{Глицерин} + \text{АТФ} \xleftrightarrow{\text{ГК}} \text{Глицерин-3-фосфат} + \text{АДФ}$$

Аденозин-5'-дифосфат (АДФ) затем превращается в АТФ фосфоенолпируват (ФЕП), в присутствии пируваткиназы (ПК) при образованиии пирувата (2):

(2) $$\text{АДФ} + \text{ФЕП} \xleftrightarrow{\text{ПК}} \text{АТФ} + \text{пируват}$$

Пируват конвертируется в лактат с помощью восстановленного никотинамидадина динуклеотида (НАДН) в присутствии лактат-дегидрогеназы (ЛДГ) (3):

(3) $$\text{пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+ \xleftrightarrow{\text{ЛДГ}} \text{лактат} + \text{НАД}^+$$

Количество $НАД^+$, образованного во время реакции, пропорционально количеству глицерина. Окисление никотинамидадина измеряется уменьшением его экстинкции при длинах волн 334 нм, 340 нм или 365 нм.

2. Аппаратура

2.1 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длине волны 340нм, при которой поглощение НАДН максимально.

Если применение спектрофотометра невозможно, возможно применение фотометра, который использует источник с прерывистым спектром, позволяющим проводить измерения на длине волны 334 нм или 365 нм.

2.2 Стеклянные ячейки с длиной оптического пути 1 см или одноразовые ячейки.

2.3 Микропипетки, позволяющие набирать объемы от 0,02 до 2 мл.

3. Реактивы

3.1 Буферный раствор (0.75 М глицилглицин, Mg^{2+} 10^{-3} М, pH = 7.4)

Растворяют 10.0 г глицилглицина и 0.25 г сульфата магния ($MgSO_4$ 7 $\cdot H_2O$) примерно в 80 мл бидистиллированной воды, добавить около 2.4 мл 5 М раствора гидроксида натрия, чтобы получить pH 7,4 и довести до 100 мл.
Данный буферный раствор может храниться 3 месяца при температуре + 4°C.

3.2 (НАДН $8.2.10^{-3}$ М, АТФ 33.10^{-3} М, ФЕП 46.10^{-3} М)

Развести:

42 мг восстановленного никотинамид-аденин-динуклеотида - Na_2
120 мг аденозин-5'-трифосфата, Na_2H_2
60 мг фосфоенол пирувата, Na и
300 мг бикарбоната натрия ($NaHCO_3$)
в 6 мл бидистиллированной воде.
Данный раствор может храниться 2-3 дня
при температуре+ 4°C.

3.3 Пируват-киназа/лактатдегидрогеназа (ПК/ЛДГ)

(ПК 3 мг /мл, ЛДГ 1 мг /мл)
Использовать суспензию, не разбавляя ее.
Данный раствор может храниться год при температуре + 4°C.

3.4 Глицеролкиназа (ГК 1 мг/мл)

Данная суспензия может храниться год при температуре + 4°C.

Примечание: Все необходимые реактивы доступны на коммерческой основе.

4. Подготовка образца

Определение глицерина производится непосредственно в вине, разбавленном бидистиллированной водой, таким образом конечная концентрация глицерина составляет от 30 до 500 мг/л. Обычно достаточно вина, разбавленного в пропорции 2/100.

5. Проведение исследования

С помощью спектрофотометра, настроенного на длину волны 340 нм, измерения оптической плотности проводятся в стеклянных ячейках с длиной оптического пути в 1 см в воздушном стандарте.

В ячейки с оптическими путями в 1 см помещают следующие элементы:

	Опорная ячейкаl	Образец ячейки
Раствор 3.1 ……	1.00 мл	1.00 мл
Раствор 3.2 ……	0.10 мл	0.10 мл
Образец для измерения……	- 0.10 мл	
Вода ……	2.00 мл	1.90 мл
Раствор 3.3 ……	0.01 мл	0.01 мл

Перемешать, и примерно через 5 минут, измерить абсорбцию(A1). Начать химическую реакцию добавив:

Раствор 3.4 ..... 0.01 мл 0.01 мл

Перемешать, дождаться завершения реакции (5 - 10 мин), измеряют абсорбцию раствора (A_2). Измеряют абсорбцию через 10 мин и проверяют каждые 2 минуты до тех пор, пока абсорбция не станет стабильной на протяжении 2 мин.
Рассчитать разницу в абсорбции можно с помощью уравнения:

$$A_2 - A_1$$

Для эталонной ячейки и ячейки образца.

Рассчитать разницу в абсорбции между эталонной ячейкой (ΔA_T) и ячейкой образца (ΔA_D) можно с помощью уравнения:

$$(\Delta A = (\Delta A_D) - (\Delta A_T)$$

6. Выражение результатов

6.1 *Расчеты*

Основная формула для расчета концентрации раствора:

$$C \quad \frac{V \ x \ PM}{\varepsilon x \ d \ x \ v \ x \ 1000} X \ \Delta \ A$$

V = объем теста в мл (3.12 мл)
v = объем образца в мл (0.1 мл)
PM = молекулярная масса определяемого вещества (глицерин = 92.1)
d = длина оптического пути ячейки (1 см)
ε = коэффициент абсорбции НАД при 340 нм

$$\varepsilon = 6.3 \text{ (ммоль}^{-1} \text{ x } l \text{ x см}^{-1})$$

Во время использования величин, данных в скобках, это сводится к:

$$C = 0.456 \text{ x } \Delta A \text{ x } F$$

F = коэффициент разбавления

Примечание:

— Измерение при 334 нм, $\varepsilon = 6.2$ (ммоль$^{-1}$ x l x см$^{-1}$)

$$C = 0.463 \text{ x } \Delta A \text{ x } F$$

— Измерение при 365 нм, $\varepsilon = 3.4$ (ммоль$^{-1}$ x l x см$^{-1}$)

$$C = 0.845 \text{ x } \Delta A \text{ x } F$$

Библиография

BOERHINGER, Mannheim, *Methods of Enzymatic and chemical analysis*, documentation technique.

Метод OIV-MA-AS312-06 Метод II типа

Масс-спектрометрическое определение отношений изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в этаноле вина или в этаноле полученном в результате брожения сусел, концентрированного сусел или виноградного сахара.

(Резолюция Oeno 17/2001)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод позволяет измерять соотношение изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в этаноле вина или вэтаноле полученном в результате брожения сусел, концентрированного сусел или виноградного сахара.

2. СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

ISO 5725 :1994 «Прецизионность методов и результатов измерения: Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения»

V-PDB : Международный образец мрамора с установленным изотопным составом углерода Vienna-Pee-Dee Belemnite (R_{PDB} = 0.0112372).

Метод OIV «Обнаружение обогащающего сусла, концентрированного сусла, и вина методом ядерного магнитного резонанса (RMN-FINS):

3. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

$^{13}C/^{12}C$: отношение изотопов углерода 13 и углерода 12 в исследуемой пробе

$\delta\,^{13}C$: Содержание изотопа углерода 13 (^{13}C), выраженное в промилле (одной тысячной доле), (‰)

RMN-FINS : Фракционирование специфичных природных изотопов, исследуемых методом ядерного магнитного резонанса.

V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite. или PDB, является основным образцом мрамора с установленным природным содержанием изотопа углерода-13. Карбонат кальция, происходит из ископаемого ракушечника из Южной Каролины (США). Его отношение изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ или показатель R_{PDB} составляет $_{RPDB}$ = 0.0112372. Источники ископаемого ракушечника PDB истощились много лет назад, но он имеет природные вариации содержания изотопа углерода 13. Справочные материалы калиброваны на основе этого содержания и доступны в Международном агентстве по атомной энергии (МАГАТЭ) в Вене (Австрия). Изотопные показания углерода 13 натурального происхождения выражены в новом международном стандартном образце V-PDB.

m/z: Отношение массы молекулы к ее заряду

4. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

В процессе фотосинтеза ассимиляция углекислого газа в растениях происходит согласно двум основным принципам метаболизма: метаболизм - C_3-путь (цикл Кальвина) и C_4-путь (цикл Хэтча - Слэка). Эти два вида метаболизма представляют собой разные типы фракционирования изотопов. Компоненты, такие как сахара и спирт, полученные из растений C_4 , имеют более высокий уровень углерода 13, чем из растений C_3.

Большинство растений, такие как виноградная лоза и свекла, принадлежат к группе С3. Сахарный тростник и кукуруза принадлежат к группе С4. Измерения содержания изотопа углерода 13 позволяют обнаружить и количественно определить добавление сахаросодержащих продуктов из С4 - растений (тростниковый сахар или кукурузный сироп - изоглюкоза) происхождение сахаров, которые добавляются в продукты, получены из винограда (виноградное сусло, вино). Комбинированный методический подход на основе метода определения содержания изотопа углерода-13 и информация, полученные методом ядерного магнитного резонанса RMN-FINS, позволяет проводить количественный анализ добавления смеси сахаров и спирта растительного происхождения, полученных из С3 и С4–растений.

Содержание изотопа углерода 13 определяют путем измерения диоксида углерода, образующегося при полном сжигании исследуемой пробы. Распределение основных изотопомеров диоксида углерода с массами 44 (12C16O2), 45 (13C16O2 и 12C17O16O), и 46 (12C16O18O), возникающее в результате различных возможных комбинаций изотопов кислорода и углерода ^{18}O, ^{17}O, ^{16}O, ^{13}C и ^{12}C, определяются путем измерения ионных токов тремя разными коллекторами масс-спектрометра. Потребление изотопомеров $^{13}C^{17}O^{16}O$ и $^{12}C^{17}O_2$ иногда не берется в расчет из-за небольшого количества.

Ионный ток по массе m/z = 45 скорректирован из вклада в интенсивность сигнала изотопомера $^{12}C^{17}O^{16}O$, которая осуществляется в соответствии с интенсивностью сигнала по массе m/z = 46 и с учетом относительного распространения изотопов кислорода ^{18}O, ^{17}O (корректировка по Крэйгу). Сравнение с калиброванным эталоном и международным эталоном V-PDB позволяет рассчитать содержание изотопа углерода по относительной шкале

5. Реактивы

Реактивы и расходные материалы зависят от приборов (6), используемых в лаборатории. Основные используемые системы основываются на элементных анализаторах. Эти системы могут быть оборудованы устройствами для введения проб, помещенных в герметичные металлические капсулы или для впрыска жидких образцов через перегородку с помощью шприца.

В зависимости от используемых инструментов, справочного материала, реактивов и расходных материалов могут быть использованы:

- Справочные материалы из МАГАТЭ:

Название	Вещество	$\delta^{13}C$ относительно V-PDB (9)
- IAEA-CH-6	Сахароза	- 10, 4‰
-IAEA-CH-7	Полиэтилен	- 31, 8 ‰
- NBS22	Масло	- 29, 7‰
- USGS24	Графит	– 16, 1 ‰

Предоставлены: IRMM Институт стандартных материалов и измерений

Название	Материал	$\delta^{13}C$ относительно V-PDB (9)
- CRM 656	Винный спирт	- 26,93 ‰
- CRM 657	Глюкоза	- 10,75 ‰
- CRM 660	Водно-спиртовой раствор (TAV 12%)	- 26,72 ‰

Стандартный рабочий образец применяют с установленным значением отношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$, калиброванным относительно международных стандартных образцов.

Стандартный список расходных материалов, установленных для систем с непрерывным потоком измерения приведен ниже

- Гелий для анализа (CAS № 07440-59-7)

- Кислород для анализа (CAS № 07782-44-7)

- Диоксид углерода для анализа, используется вторичный стандартный образец, содержащий изотоп углерода 13 (CAS № 00124-38-9)

- Реагент окисления для печи и системы сжигания приведен ниже:

оксид меди (II) для элементного анализа (CAS № 1317-38-0)

- Водопоглощающий реагент для удаления воды, вырабатываемой при сжигании. Например: ангидрон для элементного анализатора (перхлорат магния) (CAS № 10034-81-8). *Не является необходимым для аппаратов, оснащенных системой удаления воды с помощью криоловушек или через селективные проницаемые капилляры.*

6. АППАРАТУРА И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Масс-спектрометр для измерения отношений изотопов (IRMS)

Масс-спектрометрия отношений изотопов позволяет определить приблизительное содержание изотопа углерода ^{13}C в диоксиде углерода CO_2 с внутренней точностью 0.05‰ или выражен в относительном значении (9). Внутренняя погрешность устанавливается разницей между двумя параллельными измерениями одной и той же пробы диоксида углерода CO_2.

Масс-спектрометр, используемый для определения изотопного состава диоксида углерода CO2, обычно оборудован тройным коллектором для одновременного измерения интенсивности ионных токов молекул с массами m/z = 44, 45 и 46. Масс-спектрометр, используемый для измерения изотопного отношения, должен быть оборудован системой двойного ввода для поочередного измерения исследуемой пробы и стандартного образца, или использовать интегрированную систему, которая осуществляет количественное сжигание исследуемых проб и отделяет диоксид углерода от других продуктов горения перед измерением спектра масс.

6.2. Аппарат для сжигания пробы

Аппарат для сжигания способен количественно преобразовать этанол в диоксид углерода и способный удалять другие продукты горения, включая воду, не допуская изотопного фракционирования. Аппарат может представлять собой систему непрерывного потока, интегрированную в масс-спектрометр (6.2.1), или автономную систему сжигания (6.2.2). Аппарат должен обладать характеристиками, как указано в пункте (11).

6.2.1. Система непрерывного потока

Данное оборудование может быть исполнено как элементный анализатор, либо как газовый хроматограф, оснащенный онлайн-системой сжигания.

Данные лабораторные материалы используются для систем, оборудованных для введения проб, содержащихся в металлических капсулах:

- объемная микропипетка с соответствующими наконечниками
- весы с точностью взвешивания в диапазоне мкг или лучше
- пинцет для инкапсуляции
- оловянные капсулы для жидких проб
- оловянные капсулы для твердых проб

Данный лабораторный материал необходим при использовании элементного анализатора, оснащенного инжектором подачи жидкости или в случае использования хроматографической системы подготовки проб к сжиганию:

- шприц для жидкостей
- флаконы с герметичной системой укупоривания и инертными перегородками

Лабораторные материалы, указанные в списках, являются примерами, которые могут быть заменены другими материалами с эквивалентными характеристиками в зависимости от типа аппарата для сжигания и масс-спектрометрических измерений, используемых в лаборатории.

6.2.2 Автоматизированная система подготовки проб

Пробы диоксида углерода, полученные в результате сжигания анализируемых проб, и стандартные образцы собираются в бульбовые сосуды, которые затем перемещаются в двойную входную систему для проведения изотопных измерений. Для этого можно использовать несколько аппаратов сжигания, описанных ниже:

- Закрытая система сжигания, заполненная циркулирующим газообразным кислородом
- Элементный анализатор с потоками гелия и кислорода
- Стеклянный бульбовый сосуд, наполненный оксидом меди (II), используемым в качестве окислительного реагента

7. ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ИСПЫТАНИЙ

Этанол должен быть извлечен из спиртосодержащего образца перед исследованием изотопного состава. Анализ осуществляется путем дистилляции вина, как описано в разделе 3.1, используя метод RMN-FINS.

Сперва сахара должны быть сброжены для получения этанола, как описано в методе RMN-FINS в случае проведения исследования виноградного сусла, концентрированного ректификованного виноградного сусла (виноградный сахар).

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все этапы подготовки должны быть выполнены без значительных потерь этанола в результате испарения, что может повлиять на изотопный состав пробы.

Данное описание относится к процедуре, обычно используемой для сжигания проб этанола при использовании коммерческих аппаратов сжигания. Все другие методы, которые обеспечивают преобразование проб этилового спирта в диоксид углерода без испарения этанола, могут использовать подготовку углекислоты для изотопных анализов. Экспериментальная процедура основывается на данных использования элементного анализатора:

а) Поместить пробы в капсулы

- используют капсулы, пинцет и чистый поднос
- берут пинцетом подходящую по размеру капсулу
- помещают нужный объем жидкости в капсулы с помощью микропипетки

Примечание: 3.84 мг абсолютного этанола или 4.17 мг дистиллята с крепостью спирта 92% м/м необходимы для получения 2 мг углерода. Соответствующее количество дистиллята должно быть рассчитано тем же способом для обеспечения необходимого количества углерода, основываясь на чувствительности приборов масс-спектрометрии.

- закрывают капсулу с помощью щипцов.

- каждая капсула должна быть герметична. Если нет герметичности, капсулу не используют.

- для каждой пробы необходимо подготовить две капсулы

- помещают капсулы в устройстве подачи пробэлементного анализатора. Каждой капсуле должен быть присвоен порядковый номер.

- системным образом размещают капсулы со стандартным образцом в начале и в конце серии капсул с пробами.

- регулярно помешивают капсулы со стандартным образцом внутри серии проб.

б) проверяют и регулируют приборы элементного анализа и масс-спектрометра

- регулируют температуру печи элементного анализа и поток газообразного гелия и кислорода для оптимального сжигания проб;

- проверяют систему элементного анализа и систему масс-спектрометрии на наличие утечек
(например проверив измерения ионных токов по массе m/z = 28 азота N_2.);

- проверяют масс-спектрометр на диапазон измерения ионных токов по массам m/z = 44, 45 и 46;

- проверяют систему путем измерения стандартного образца, прежде чем начинать измерение образцов.

в) Проводят серию измерений

Пробы в системе элементного анализатора или в хроматографической системе исследуют последовательно. Диоксид углерода после сжигания каждой пробы направляют в масс-спектрометр, который измеряет ионный ток. Компьютерный интерфес считывает интенсивность ионного тока и рассчитывает значения показателя δ для каждой пробы (9).

9. РАСЧЕТЫ

Цель метода заключается в измерении отношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ этанола, выделенного из вина или из сброженных продуктов переработки винограда. Отношение изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ может быть выражено его отклонением от стандартного образца. Содержание изотопа углерода 13 ($\delta\ ^{13}C$) рассчитывается по шкале δ в виде тысячной доли при сравнении значений, полученных для исследуемой пробы, и значений для стандартного образца, предварительно калиброванного

относительно первичного международного стандартного образца (V-PDB). Значение показателя пробы, измеренное относительно рабочего стандартного образца δ ^{13}C, представлено в сравнении со стандартным образцом и вычисляется по формуле:

$$\delta^{13}C_{пр/стан}‰ = 1000 \times (R_{пр} - R_{стан})/R_{стан}$$

где $R_{пр}$ и $R_{стан}$ отношение изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ соответствует пробе и стандартному образцу.

Таким образом, значения содержания изотопа углерода ^{13}C, с учетом международного стандартного образца V-PDB, выражают по формуле:

$$\delta^{13}C_{пр/V\text{-}PDB}‰ = \delta^{13}C_{пр/стан} + \delta^{13}C_{стан/V\text{-}PDB} + (\delta^{13}C_{пр/стан} \times \delta^{13}C_{стан/V\text{-}PDB})/1000$$

где $\delta^{13}C_{стан/V\text{-}PDB}$ является значением показателя для рабочего стандартного образца, калиброванного относительно первичного международного стандартного образца V-PDB.

Небольшие отклонения между измеренными значениями проб могут возникать при измерении в режиме реального времени из-за изменений в инструментальных условиях. В этом случае значение показателя δ ^{13}C должно быть скорректировано согласно разницам измеренного значения показателя $\delta^{13}C$ рабочего стандартного образца и его паспортным значением, которое было предварительно откалибровано по первичному международному стандартному образцу V-PDB. Между двумя измерениями рабочего стандартного образца и применяемая корректировка результатов измерения пробы подчиняются линейной зависимости. Рабочий стандартный образец должен быть измерен в начале и в конце всех измерений каждой серий проб. Поправка может быть рассчитана для каждого образца, путем линейной интерполяции между двумя значениями (разница между паспортным значением рабочего стандартного образца и измеренным значением этого образца).

10. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЯ И КОНТРОЛЬ

Убедитесь, что значения содержания изотопов углерода ^{13}C в рабочем стандартном образце не отличаются более чем на 0.05‰ между измеренным и паспортным значением. Если имеются различия, настройки масс-спектрометра должны быть проверены и возможно перенастроены.

Для каждой пробы разница между двумя измеренными значениями пробы в капсулах не должна превышать 0.3‰. Если различие превышает 0.3‰, измерения следует повторить.

Условия измерительного мониторинга могут быть основаны на регистрации интенсивности ионного тока по массе m/z = 44 и пропорциональны количеству углерода, введенного в пробу. В стандартных условиях измерения силы ионного тока должны быть практически постоянной для анализируемых проб.
Значительное расхождение может свидетельствовать об испарении этанола из-за нестабильности элементного анализатора или масс-спектрометра.

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ МЕТОДА (Презинзиозность)

В рамках совместного анализа (11.1) исследовались дистилляты, содержащие спирт виноградного происхождения, тростникового и свекольного, а также смеси спиртов указанного происхождения. Это исследование не принимало во внимание стадию дистилляции, так же были рассмотрены результаты других межлабораторных исследований вина (11.2), а именно схемы тестов на пригодность (11.3) к изотопным измерениям. Общие результаты показывают, что различные системы дистилляции при удовлетворительных условиях, и, в частности, тех, которые используются для метода RMN-FINS, не имеют существенных изменений для определения показателя $\delta^{13}C$ в вине. Параметры прецизионности, полученные для вина, почти идентичны параметрам, полученным в межлабораторном исследовании для дистиллятов. (11.1).

11.1. Совместное исследование дистиллятов

Год совместных лабораторных исследований: 1996

Количество лабораторий: 20

Количество образцов: 6 образцов для сравнения «двойным слепым» методом

Анализ: показатель $\delta\ ^{13}C$ этанола

Код образца	Спирт виноградного происхождения	Свекольный спирт	Спирт из тростникового сахара
A & G	80%	10%	10%
B & C	90%	10%	0%
D & F	0%	100%	0%
E & I	90%	0%	10%
H & K	100%	0%	0%
J & L	0%	0%	100%

Образцы	A / G	B / C	D / F	E / I	H / K	J / L
Количество лабораторий, оставшихся после устранения ошибочных результатов	19	18	17	19	19	19
Количество принятых результатов	38	36	34	38	38	38
Среднее значение ($\delta\ ^{13}C$) ‰	-25.32	-26.75	-27.79	-25.26	-26.63	-12.54
Sr^2	0.0064	0.0077	0.0031	0.0127	0.0069	0.0041
Стандартное отклонение повторяемости (Sr) ‰	0.08	0.09	0.06	0.11	0.08	0.06
Предел повторяемости r ($2,8\times S_R$) ‰	0.22	0.25	0.16	0.32	0.23	0.18
S_{R^2}	0.0389	0.0309	0.0382	0.0459	0.0316	0.0584
Стандартное отклонение воспроизводимости (S_R) ‰	0.20	0.18	0.20	0.21	0.18	0.24
Предел воспроизводимости R ($2,8\times S_R$) ‰	0.55	0.9	0.55	0.60	0.50	0.68

11.2. Объединенные лабораторные исследования с двумя образцами вина и одним образцом спирта

Год совместных лабораторных исследований: 1996

Количество лабораторий:

Измерения показателя $\delta^{13}C$ этанола в вине: 14 для дистилляции вина 7 также для 8 для измерения показателя $\delta^{13}C$ в образце спирта

Количество образцов: 3 (Белое вино TAV 9.3% об, Белое вино TAV 9.6% об, крепость спирта 93% м)

Анализ: Исследование показателя $\delta^{13}C$ в этаноле

Образцы	Красное вино	Белое вино	Спирт
Количество лабораторий	7	7	8
Количество принятых результатов	7	7	8
Среднее значение ($\delta^{13}C$) ‰	-26.20	-26.20	-25.08
Отклонение воспроизводимости S_R^2	0.0525	0.0740	0.0962
Стандартное отклонение воспроизводимости(S_R)‰	0.23	0.27	0.31
Предел воспроизводимости R (2,8× S_R) ‰	0.64	0.76	0.87

Различные системы дистилляции были использованы в лабораториях. Исследования показателя $\delta^{13}C$, полученные в одной лаборатории по всему количеству дистиллятов, возвращенных участниками, не выявили бессмысленных значений или значительно отличающихся средних значений. Отклонение результатов в данном исследовании (S^2 = 0.0059) сравнимо с отклонениями повторяемости Sr^2, полученном в межлабораторном исследовании дистиллятов (11.1).

11.3. Результаты тестов на компетентность изотопных измерений

С декабря 1994 регулярно проводились международные квалификационные испытания для определения компетентности изотопных измерений вина и спирта (дистилляты крепостью 96% об). Результаты позволяют участвующим лабораториям проверять качество своих анализов. Статистические результаты позволяют оценить приемлемость в принятых условиях воспроизводимости метода.

Это позволяет оценить параметры несоответствий и предел воспроизводимости. Результаты, полученные для вина и этанола в дистилляте $\delta^{13}C$, приведены в таблице ниже:

	Вино				Дистилляты			
Дата	N	S_R	S^2_R	R	N	S_R	S^2_R	R
Дек. 1994	6	0.210	0.044	0.59	6	0.151	0.023	0.42
Июнь 1995	8	0.133	0.018	0.37	8	0.147	0.021	0.41
Дек. 1995	7	0.075	0.006	0.21	8	0.115	0.013	0.32
Март 1996	9	0.249	0.062	0.70	11	0.278	0.077	0.78
Июнь 1996	8	0.127	0.016	0.36	8	0.189	0.036	0.53
Сент. 1996	10	0.147	0.022	0.41	11	0.224	0.050	0.63
Дек. 1996	10	0.330	0.109	0.92	9	0.057	0.003	0.16
Март 1997	10	0.069	0.005	0.19	8	0.059	0.003	0.16
Июнь 1997	11	0.280	0.079	0.78	11	0.175	0.031	0.49
Сент 1997	12	0.237	0.056	0.66	11	0.203	0.041	0.57
Дек. 1997	11	0.127	0.016	0.36	12	0.156	0.024	0.44
Март 1998	12	0.285	0.081	0.80	13	0.245	0.060	0.69
Июнь 1998	12	0.182	0.033	0.51	12	0.263	0.069	0.74
Сент 1998	11	0.264	0.070	0.74	12	0.327	0.107	0.91
Взвешенное среднее значение		0.215	0.046	0.60		0.209	0.044	0.59

N : количество участвующих лабораторий

12. БИБЛИОГРАФИЯ

Определение обогащения сусла, концентрированного сусла, виноградных сахаров с применением ядерного магнитного резонанса дейтерия (RMN-FINS/SNIF-NMR)

E.C. Предписание. Аналитические методы, которые могут быть применены в винном секторе, N°.2676/90. Определение обогащения сусла, концентрированного виноградного сусла, ректификованного концентрированного сусла и вин, с применением ядерного магнитного резонанса дейтерия (SNIF-NMR*)*

Official Journal of the European Communities, N°L 272, Vol 33, 64-73, 3 October 1990.

Межлабораторные исследования определения $\delta^{13}C$ в винном этаноле

OIV FV Nº 1051

Fidelité de la determination du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de l'éhanol du vin

OIV FV Nº 1116.

Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. A Rossmann ; H-L Schmidt ; F. Reniero ; G. Versini ; I. Moussa ; M.-H. Merle. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1996, 203, PP. 293-301.

Метод OIV-AS312-07 Метод **IV** типа

Метод определения отношений изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине вина с помощью газовой хроматографии сжигания или высокоэффективной жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (GC-C-IRMS или HPLC- IRMS)

(OIV-Oeno 343-2010)

1. ОБЪЕМ

Настоящие методы, предусматривает применение газовой хроматографии [1] или жидкостной хроматографии [2] в сочетании с масс-спектрометрией (GC-C-IRMS или HPLC-IRMS), для измерения отношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине. При необходимости определения его количества одновременно с измерением отношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$, применяется ГХ.
Использование 1,5-пентандиола в качестве внутреннего стандарта также позволяет обеспечить определение концентрации глицерина с одновременным анализом в нем отношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

$^{13}C/^{12}C$: отношение изотопов углерода-13 (^{13}C) и углерода-12 (^{12}C) в исследуемой пробе.

$\delta^{13}C$: содержание углерода-13 (^{13}C) выражается в промилле (одной тысячной доле), (‰, на мл).

ГХ-C-IRMS – популярный метод газовой хромотографии в сочетании с интерфейсом для сжигания пробы и масс-спектрометрией для измерения отношения изотопов.

V-PDB: Vienna-Pee-Dee-Belemnite. PDB является основным первичным международным стандартным образцом ископаемого ракушечника, с установленным природным содержанием изотопа углерода ^{13}C, содержащим карбонат кальция из ископаемого ракушечника из Южной Каролины (США). Изотопный состав углерода $^{13}C/^{12}C$ или R_{PDB} составляет 0.0112372. Запас ископаемого ракушечника PDB исчерпан много лет назад, но он остался основным международным стандартным образцом с установленным природным содержанием изотопа углерода-13, предлагается для использования в настоящее время МАГАТЭ *(Международное Агентство Атомной Энергии*) в Вене (Австрия). Изотопные признаки, встречающего в природе углерода-13 условно выражаются в новом стандартном образце V-PDB.

3. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Существует значительная разница в содержании изотопа углерода-13 в сахарах растений обуславливается в разных циклах фотосинтеза:
путь C_3 (цикл Кальвина) и путь C_4 (цикл Хэтча-Слека). Большинство растений, такие как виноград и сахарная свекла, относятся к растениям группы C_3, в то время как кукуруза и тростник относятся к группе C_4. Содержание изотопа углерода-13 коррелировано в сахарах и соответствующих метаболитах, образованных при брожении (этанол, глицерин).
Измерение содержания изотопа углерода-13 может позволить обнаружить добавление в вина или спиртные напитки глицерина из кукурузы (растения группы C_4) или синтетического глицерина (ископаемые источники).
Выделение глицерина из матрицы вина достигается использованием газовой или жидкостной хромотографией.
В ГХ-C-IRMS, после хромотографического отделения, аналит проходит стадии сжигания и восстановления, проходя через реактор окисления и восстановления. Иные компоненты пробы, исключая глицерин, например растворитель, удаляют через специальную систему вентилей, которой оснащено устройство, чтобы избежать загрязнения печи и помех в хроматограммах. Содержание изотопа углерода-13 определяется измерением окисления диоксида углерода, который образуется при сжигании глицерина, содержащегося в образце. После окисления глицерина образуется CO_2 и H_2O. Вода, полученная в ходе сжигания, удаляется мембранным водоотделителем Nafion® . Образовавшийся диоксид углерода в потоке гелия направляют для измерения для измерения отношения изотопов углерода в ионный источник масс-спектрометра IRMS.
В ВЭЖХ-IRMS, аналит после хроматографического разделения, подвергают окислению непосредственно в подвижной фазе устройства. Образовавшийся диоксид углерода CO_2 переводят в режиме реального времени из потока растворителя через газообменную мембрану в поток гелия He. Этот поток гелия He проходит через мембранную ловушку, Nafion®, и затем направляется в ионный источник масс-спектрометра IRMS через открытый делитель потока.
Различные допустимые комбинации изотопов кислорода и углерода ^{18}O, ^{17}O, ^{16}O и ^{13}C, ^{12}C, распределяют основные изотопомеры диоксида углерода с массами 44 ($^{12}C^{16}O_2$), 45 ($^{13}C^{16}O_2$, $^{12}C^{17}O^{16}O$) и 46 ($^{12}C^{16}O^{18}O$), результирующими из различных комбинаций изотопов кислорода и углерода $^{13}C^{17}O^{16}O$ и $^{12}C^{17}O_2$, в некоторых случаях может быть упущен из-за их незначительного присутствия. Соответствующие ионные токи определяются тремя разными коллекторами масс-спектрометра. Ионный ток по массе m/z=45 корректируется из вклада в интенсивность сигнала $^{12}C^{17}O^{16}O$, который рассчитывается из интенсивности сигнала по массе m/z=46, принимая во внимание распространения изотопов кислорода ^{18}O и ^{17}O (т.е. корректировка по Крейгу). Сравнение результата измерения с калиброванным стандартным образцом и международным стандартным образцом V-PDB, позволяет рассчитать содержание изотопов углерода-13 по относительной шкале показателя $\delta^{13}C$ ‰.

4. РЕАКТИВЫ

Следует использовать следующие реактивы и рабочие стандарты:

4.1 Безводный этанол (CAS № 64-17-5).
4.2 Чистый глицерин ≥ 99 % (CAS № 56-81-5).
4.3 1,5-пентандиол (CAS № 111-29-5).
4.4 Раствор 1,5-пентандиола (4.3) в этаноле (4.1). Этот раствор, приготовленный при точной концентрации в диапазоне от 0.5 до 1.0 г/л$^{-1}$, используется для разбавления исследуемых образцов вина.
4.5 Ортофосфорная кислота
4.6 Пероксодсульфат натрия, используется как реагент окисления
4.7 Гелий для анализа, используемый в качестве газа носителя (CAS № 07440-59)
4.8 Кислород для анализа, используемый в качестве регенерирующего газа для окислительного реактора (CAS № 07782-44-7).
4.9 Баллон с диоксидом углерода для анализа, используемый в качестве вторичного стандартного образца для определения содержания изотопа углерода-13 (CAS № 00124-38-9).
4.10 Рабочие стандартные образцы глицерина с установленным изотопным составом углерода $^{13}C/^{12}C$, калиброванным относительно международного стандартного образца.

4.11 Рабочие стандартные образцы 1,5-пентандиол с установленным изотопным составом углерода $^{13}C/^{12}C$, калиброванным относительно международного стандартного образца.

5. АППАРАТУРА И ОБОРУДОВАНИЕ

5.1. Масс-спектрометрия изотопного отношения

Масс-спектрометр (IRMS) для измерения отношений изотопов, позволяющий определять относительное содержание изотопа углерода ^{13}C в диоксиде углерода CO_2 с внутренней точностью измерения 0.05 ‰ или относительным значением, выраженным согласно (пункт 8. Расчёты). Внутренняя погрешность в данном случае выражена разницей между двумя параллельными измерениями одной и той же пробы диоксида углерода CO_2. Масс-спектрометр, используемый для определения изотопного состава, оснащен тройным коллектором для одновременного измерения ионных токов молекул с массами m/z = 44, 45 и 46. IRMS оснащен программным обеспечением для проведения анализа, получения данных и обработки результатов анализа для расчета изотопных отношений.

5.2. Газовый хромотограф

Газовый хромотограф (ГХ), соединенный с устройством для сжигания пробы и масс-спектрометром для измерения отношения стабильных изотопов (5.1).

Газовый хроматограф должен быть оснащен полярной капиллярной колонкой, позволяющей хроматографическое отделение глицерина от других компонентов вина
(например, колонка Chrompack WCOT из плавленого кварца, заполненная связанным полиэтилен-глицерином CP-Wax-57 CB, 25 м, 0.25 мм, 0.20 мкм толщина пленки).

Интерфейс для сжигания пробы, состоящий из реактора окисления (керамическая трубка, содержащая никелевую, платиновую и медную проволоку) и реактора восстановления (керамическая трубка, содержащая медную проволоку).

5.3. Жидкостный хромотограф

Жидкостный хромотограф (ЖХ) соединен через интерфейс LC Isolink с масс·спектрометром для измерения отношения стабильных изотопов (5.1).

Жидкостный хромотограф должен быть оснащен колонкой, позволяющей проводить хромотографическое отделение глицерина от других компонентов вина без использования органических растворителей или добавок (н-р. HyperREZ углевод H^+, 30 см, 8 мм).

Интерфейс Isolink, состоящий из капиллярного реактора окисления и мембранного теплообменника (три мембраны).

5.4. Оборудование

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, приведенное ниже:

- Шприцы для ввода проб или автоматический пробоотборник

- Мембранные фильтры с диаметром пор, 0.2 мкм, мерные колбы, хроматографические флаконы и шприц вместимостью 10 мкл для жидких субстанций.
Лабораторное оборудование, которое перечислено в списке выше является примером и может быть заменено другим эквивалентным оборудованием.

6. ПОДГОТОВКА ПРОБ

6.1. Определение изотопного состава углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине в инструментальном варианте GC-C-IRMS
Каждый образец вина проведен через мембранный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм и затем аликвоту разбавляют этанолом (в пропорции 1:4). Каждую пробу затем перемещают в надлежащую хроматографическую пробирку, которая плотно закрывается и хранится при температуре $T \leq 4$ °C до проведения анализа.

6.2. Изотопный состав углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине и определение его количества в пробе с помощью GC-C-IRMS
Каждый образец вина, проводится через фильтр 0.2 мкм, а затем аликвота разбавляется (в пропорциях 1:4) основным раствором 1,5-пентандиола (4.4). Затем каждую пробу перемещают в надлежащую хромотографическую пробирку, которая затем плотно закрывается и хранится при температуре $T \leq 4$ °C до проведения анализа.

6.3. Определение изотопного углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине с помощью HPLC-IRMS

Каждый образец вина проводится через мембранный фильтр, 0.2 мкм, и затем аликвота разводится водой. Затем каждый образец перемещается в определенную хромотографическую пробирку, которая затем плотно закрывается и хранится при температуре $T \leq 4$ °C до проведения анализа.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1. GC-C-IRMS

Следующее описание относится к процедурам, в основном используемым для определения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине, с использованием коммерческих автоматических систем GC-C-IRMS.

Процедура может быть адаптирована под изменения, представленные на заводах.
Примечание: объем, температура, поток и время являются ориентировочными. Корректные значения должны быть оптимизированны согласно инструкциям производителя.

7.1.1 Рабочие условия

При использовании колонки и интерфейса для сжигания пробы, описанные в качестве примера в пункте 5.2, могут быть применены по следующим параметрам:
A. Температура инжектора установлена на 270 °C.
B. Температурная программа установлена следующим образом: начальная температура колонки 120°C; время выдержки 2 мин; затем температура повышается со скоростью 10 °C мин$^{-1}$ до финального значения в 220 °C с конечным временем выдержки в 2 мин.
Каждый анализ занимает 14 мин, без учета времени, которое необходимо для охлаждения
C. Гелий не используется как газ-носитель.
D. Температуры окислительного и восстановительного реакторов в ГХ для сжигания установлены соответственно на 960 и 640°C.
E. Каждое введение пробы в колонку хроматографа, объемом 3 мкл, используя режим высокого деления (разделенный поток 120 мл мин$^{-1}$).
При регулярных интервалах (например, раз в неделю) требуется повторное окисление реактора посредством подачи кислорода O_2 (интервалы зависят от общего количества субстанций, которые проходят через реактор).

7.1.2. Изотопный состав углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине

Во время проведения каждого анализа изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ вводятся, по меньшей мере, два опорных импульса рабочего стандартного образца газа CO_2 (4.9) из цилиндра. Этот образец CO_2 предварительно калибруется по международным стандартным образцам V-PDB, которые откалиброваны относительно стандартных образцов МАГАТЭ. Рабочий стандартный образец CO_2 также может быть откалиброван относительно внутренних стандартных образцов.
Каждый образец вина (6.1) вводится три раза. Подходящие контрольные образцы должны быть включены в каждую пробу.
Типичная серия проб выглядит следующим образом:
• Контрольная проба
• Контрольная проба
• Проба 1
• Проба 1
• Проба 1
• Проба 2
Каждую пробу измеряют три раза
• …..
• Проба 6
• Проба 6
• Проба 6
• Контрольная проба
• Контрольная проба

Контрольная проба – спиртовой раствор глицерина, с точно известным значением показателя δ^{13},измеренным, например, с помощью элементного анализатора-IRMS), позволяет проверить возможный дрифт значений в ходе измерения серии проб.

7.1.3 Изотопный состав углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине и его количественное определение

Если количественная оценка глицерина требуется в то же самое время, что и измерение изотопного состава углерода $^{13}C/^{12}C$, применяется вышеописанная процедура в отношении проб (7.1.2), подготовленных, как описано в пункте 6.2.
1,5-пентандиол (4.3) позволяет провести определение концентрации глицерина. Более того, значения показателя $\delta^{13}C$ для внутреннего стандарта могут быть использованы для корректировки результатов анализа и контроля качества измерений изотопного состава и реакций окислительно-восстановительного преобразования пробы.
Концентрация глицерина в образцах вина определяется использованием метода внутреннего стандарта. Для того, чтобы это сделать, строят график, используя раствор 1,5-пентандиола установленных концентраций и раствор глицерина пяти концентраций в диапазоне от 0.50 до 10 г/л$^{-1}$. Эти растворы приготовлены взвешиванием и растворением глицерина(4.2) и 1,5-пентандиола в этаноле (4.1), используя мерные колбы. Убедиться, что линейный отклик измеренных в ходе анализа значений при исследовании проб в трех повторениях согласно построенной линейной зависимости для растворов, содержащих внутренний стандарт.

7.2. ВЭЖХ-IRMS

Данное описание относится к процессам, в основном используемым для исследования отношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине, используя коммерческие автоматизированные системы ВЭЖХ-IRMS.

Исследования могут быть адаптированы согласно изменениям, которые рекомендуют изготовители.
Примечание: объемы, температура, поток и время являются примерами. Корректные значения следует оптимизировать согласно указаниям производителя.

7.2.1 Рабочие условия

Использование колонки и интерфейса для сжигания пробы, описанных в примере в пункте 5.3, могут применяться по следующим параметрам:

A. Скорость потока элюента устанавливается на 400 мкл/ мин$^{-1}$
B. Скорость потоков кислоты и окислительных реагентов в ЖХ-устройстве установлены на 40 и 30 мкл/ мин$^{-1}$, соответственно
C. Температуры интерфейсного реактора и колонки установлены на уровне 99.9 и 65°C, соответственно
D. Скорость потока гелия при разделении установлен на уровне 1 мкл/ мин$^{-1}$

Флаконы с реагентами дегазируют гелием в течение всего хроматографического анализа

7.2.2. Изотопный состав углерода $^{13}C/^{12}C$ в глицерине

Во время измерения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$, в системе генерируют не менее двух импульсов рабочего стандартного образца газа CO_2 (4.9), (см. пример хроматограмм в 11.2). Этот диоксид углерода CO_2 предварительно откалиброван относительно международных стандартных образцов V-PDB, которые в свою очередь откалиброваны по международным стандартам МАГАТЭ. Рабочий стандартный образец диоксида углерода CO_2 также может быть откалиброван по внутрилабораторным стандартным образцам.
Каждый образец вина (6.3) исследуют три раза. Соответствующие пробы со стандартными образцами, должны быть включен в каждую серию проб.
Типичная серия проб выглядит следующим образом:
• Контрольная проба
• Контрольная проба
• Проба 1
• Проба 1
• Проба 1
• Проба 2
Каждый образец измеряется трижды
• …..
• Проба 6
• Проба 6
• Проба 6
• Контрольная проба
• Контрольная проба
Контрольная проба - это спиртовой раствор глицерина с установленным измеренным значением показателя $\delta^{13}C$ (с помощью элементного анализатора-IRMS, например), позволяет проверить возможный дрифт в ходе измерений и скорректировать результаты.

8. РАСЧЕТ

8.1. Значение изотопного состава углерода $^{13}C/^{12}C$

Значение изотопного состава углерода $^{13}C/^{12}$ C может быть выражено относительно рабочего стандартного образца.

Содержание изотопа углерода-13 (как показатель δ ^{13}C) рассчитывают по шкале δ в виде тысячной доли в сравнении значений (δ /1000 или δ ‰), полученных для исследуемой пробы, и значений для стандартного образца, предварительно калиброванного относительно первичного международного стандартного образца

(V-PDB). Во время измерения изотопов $^{13}C/^{12}C$, вводится стандартный образец диоксида углерода CO_2, который калибруется относительно международного стандартного образца, который в свою очередь калиброван относительно международного стандартного образца PBD.

Значения δ 13C выражены относительно рабочего стандартного образца, вычисляют по формуле:

$$\delta^{13}C_{\text{проба/стан}}‰ = (R_{\text{проба}}/R_{\text{стан}} - 1) \times 1000$$

Где $R_{\text{проба}}$ и $R_{\text{стан}}$ представляют собой, соответственно, отношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в пробе и стандартном образце (4.9).

Значения δ ^{13}C выражены относительно первичного международного стандартного образца V-PDB вычисляют по формуле:

$$\delta^{13}C_{\text{проба/V-PDB}}‰ = \delta^{13}C_{\text{проба/стан}} + \delta^{13}C_{\text{стан/V-PDB}} + (\delta^{13}C_{\text{проба/стан}} \times \delta^{13}C_{\text{стан/V-PDB}})/1000,$$

где значения $\delta^{13}C_{\text{стан/V-PDB}}$ представляют предварительно определенное изотопное отклонение от рабочего стандартного образца V-PDB

Небольшие отклонения могут возникать при измерении в режиме реального времени по причине изменений характеристик инструментального оборудования. При этом значения показателя $\delta^{13}C$ должны быть скорректированы в соответствии с разницей между измеренным значением показателя δ ^{13} C и его паспортным значением, предварительно откалиброванным относительно первичного стандартного образца V-PDB. Между вариациями двух измерений рабочего стандартного образца и применяемая корректировка результатов измерения пробы подчиняются линейной зависимости. Рабочий стандартный образец должен быть исследован в начале и в конце измерений каждой серии проб. Затем можно рассчитать поправку для каждого образца с помощью линейной интерполяции.

8.2. Концентрация глицерина по данным ГХ-IRMS

При построении калибровочного графика и каждом вводе пробы, учитывается измеряемый параметр – площадь пика S (в V*s), определяемая спектрометром.

Рассчитывают отношения R, выраженное ниже в уравнении 1, и строят график зависимости R от отношения C концентраций глицерина и внутреннего стандарта (IS),.
Должен быть получен линейный график с коэффициентом корреляции не менее 0.99.

Уравнение 1 $$R=\frac{\text{Площадь пика глицерин}}{\text{Площадь пика IS}}$$

Используя аналитические условия, описанные в (7.1.1), 1,5-пентандиол, будучи менее полярным, чем глицерин, показывает время удерживания около 310 сек., тогда как время удерживания глицерина составляет 460 сек., (см. пример хроматограммы в 11.1).
Концентрацию глицерина в каждой пробе рассчитывают по следующему уравнению:

Уравнение 2 $$C_{\text{глицерин Проба}} = K \cdot C_{1,5\text{ПД Проба}} \cdot \frac{S_{\text{глицерин Проба}}}{S_{1,5\text{ПД Проба}}} \times \text{коэфф. разбавления}$$

где:

$Cx_{Проба}$ - концентрация внутреннего стандарта в пробе, г/л$^{-1}$;

$SX_{Проба}$ – площадь образующихся пиков;

K (фактор отклика) рассчитывается следующим образом:

$$K = \frac{C_{\text{глиц стан}}}{C_{1,5\text{ПД стан}}} \cdot \frac{S_{1,5\text{PD стан}}}{S_{\text{глиц стан}}}$$ Уравнение 3 (см. 8.2)

Обозначение «стан» указывает на концентрации и площади пиков 1,5-пентандиола и глицерина в пяти стандартных растворах, приготовленных для калибровки (7.1.3);

Фактор разбавления: с учетом условий отбора проб, описанных выше (7), в этом случае коэффициент разбавления равен 4.

Значение концентрации в г/л$^{-1}$ для каждой пробы представляет собой среднее арифметическое значение трех параллельных введений (впрысков)

9. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА И КОНТРОЛЬ

9.1. ГХ-С-IRMS

Для каждой пробы убедитесь, что значение стандартного отклонения (SD) в трех последовательно измеренных флаконах составляет менее 0.6 ‰. Конечным результатом для данной пробы является среднее значение арифметическое значение, рассчитанное по результатам для трех измерений. Если отклонение превышает 0.6 ‰, измерение необходимо повторить.

Контроль качества измерений может быть основан на интенсивности ионного тока по массе m/z = 44, которая пропорциональна количеству углерода, введенного в пробу. В стандартных условиях ионный ток в анализируемых пробах должен быть практически постоянным. Значительные отклонения могут свидетельствовать о недодасточном разделении и окислении глицерина или нестабильности работы масс-спектрометра.

9.2. ВЭЖХ-IRMS

Проверяют значение по изотопу углерода ^{13}C для рабочего стандартного образца, чтобы оно не отличалось более чем на 0.5 ‰ от паспортного значения. В противном случае следует проверить настройки спектрометра и при необходимости отрегулировать.
Для каждой пробы необходимо убедиться, что значение стандартного отклонения (SD) в трех последовательно измеренных флаконах составляет менее 0.6 ‰. Конечным результатом для данного образца является среднее арифметическое значение, рассчитанное по результатам трех измерений. Если отклонение между результатами превышает 0.06 ‰, измерение следует повторить.

Контроль правильности измерений может быть основан на интенсивности ионного тока по массе m/z = 44, которая пропорциональна количеству углерода, введенного в элементный анализатор. В стандартных условиях измерения ионный ток должен быть практически постоянным для всех анализируемых проб. Значительное отклонение может свидетельствовать о недостаточном разделении и окислении глицерина или нестабильности масс-спектрометра.

10. ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДА

10.1. ГХ-С-IRMS

10.1.1 Прецизионность

Предварительные исследования были проведены на 4 растворах синтетических вин (вода-эталон-глицерин), приготовленных с использованием образцов глицерина различного происхождения и с установленными значениями показателя $\delta^{13}C$, измеренными, например, с помощью элементного анализатора EA-IRMS. Для трех параллельных определений, n=3, использовалась техника инструментального варианта ГХ-C-IRMS стандартное отклонение ≤ SD 0.6 ‰ считается допустимым.

На прецизионность может повлиять перекрытие пика между 1,5-пентандиола и пиков других компонентов вина или побочных продуктов при исследовании сладких вин.

10.1.2. Определение концентрации глицерина

Для проверки этого метода, используются два раствора глицерина. Допуская, что типичная концентрация глицерина в сухом вине проходят в диапазоне от 4 до 10 г/л$^{-1}$, 2 раствора глицерина проходят в этом диапазоне. Концентрация первого раствора составила 4.0 г/л $^{-1}$

а значение, измеренное в эксперименте, 3.6 г/л $^{-1}$ (SD = 0.2, n=8); во втором растворе концентрация составила 8,0 и 7,9 г/л$^{-1}$ (SD= 0.3/ n = 8).

В дальнейшем в исследовании использовались пять образцов вина (A-E), которые в рамках BIPEA по оценке компетентности лабораторий другими методами определена концентрация глицерина.

Таблица 1: Сравнение концентраций глицерина в 5 образцах вина.

Образец	A	B	C	D	E
Тип	Белое	Розовое	Белое	Красное	Белое
Заданный диапазон	6.2 – 8.4	4.8 – 6.6	5.7 – 7.7	6.3 – 8.5	4.6 – 6.2
Среднее значение	7.3	5.4	6.7	7.4	5.4
ГХ-C-IRMS	6.4	5.4	6.7	7.8	5.4

*В тесте BIPEA определение концентраций глицерина были предоставлены с помощью метода ВЭЖХ и/или ферментативного анализа. Концентрации приведены в г/л$^{-1}$. n>3 и SD < 0.6.

Концентрация глицерина, обнаруженная при помощи GC-C-IRMS совместима с объемом, полученным при использовании других аналитических техник, таких как ферментативное определение или HPLC.

10.2. ВЭЖХ-IRMS

Внутренняя проверка метода ВЭЖХ-IRMS

Для проверки метода ВЭЖХ-IRMS использовались следующие образцы:
Стандартный образец глицерина, три синтетических образца вина (глицерин колеблется в пределах типичной концентрации, обнаруженной в винах) и вино.
Прецизионность определения глицерина установлена путем проведения десятикратного анализа каждой пробы в воспроизводимых условиях. А также путем проведения десяти независимых анализов одной и той же пробы в воспроизводимых условиях в три разных дня (Таблица 2).

Таблица 2. Точность и прецизионность измерений значения δ13C для глицерина с помощью ВЭЖХ-IRMS.

		ВЭЖХ-IRMS							
		День 1		День 2		День 3		Прецизионность	
Образец	Повторяемость в образце	Ср.значение $\delta^{13}C$ (‰)	SD (‰)	Ср.значение $\delta^{13}C$ (‰)	SD (‰)	Ср.значение $\delta^{13}C$ (‰)	SD (‰)	r (‰)	R (‰)
Глицерин (стандарт)[b]	10	-27.99	0.05	-27.94	0.04	-27.95	0.08	0.17	0.18
Синтетическое вино (6 г/л)	10	-28.06	0.13	-28.14	0.12	-28.14	0.11	0.34	0.35
Синтетическое вино (8 г/л)	10	-28.11	0.12	-28.18	0.07	-28.21	0.07	0.25	0.28
Синтетическое вино (10 г/л)	10	-28.06	0.06	-28.06	0.09	-28.05	0.09	0.23	0.24
Вино	10	-28.88	0.10	-28.85	0.27	-28.72	0.23	0.60	0.62

[a]**Значения ^{13}C выражены в ‰ vs V-PDB**

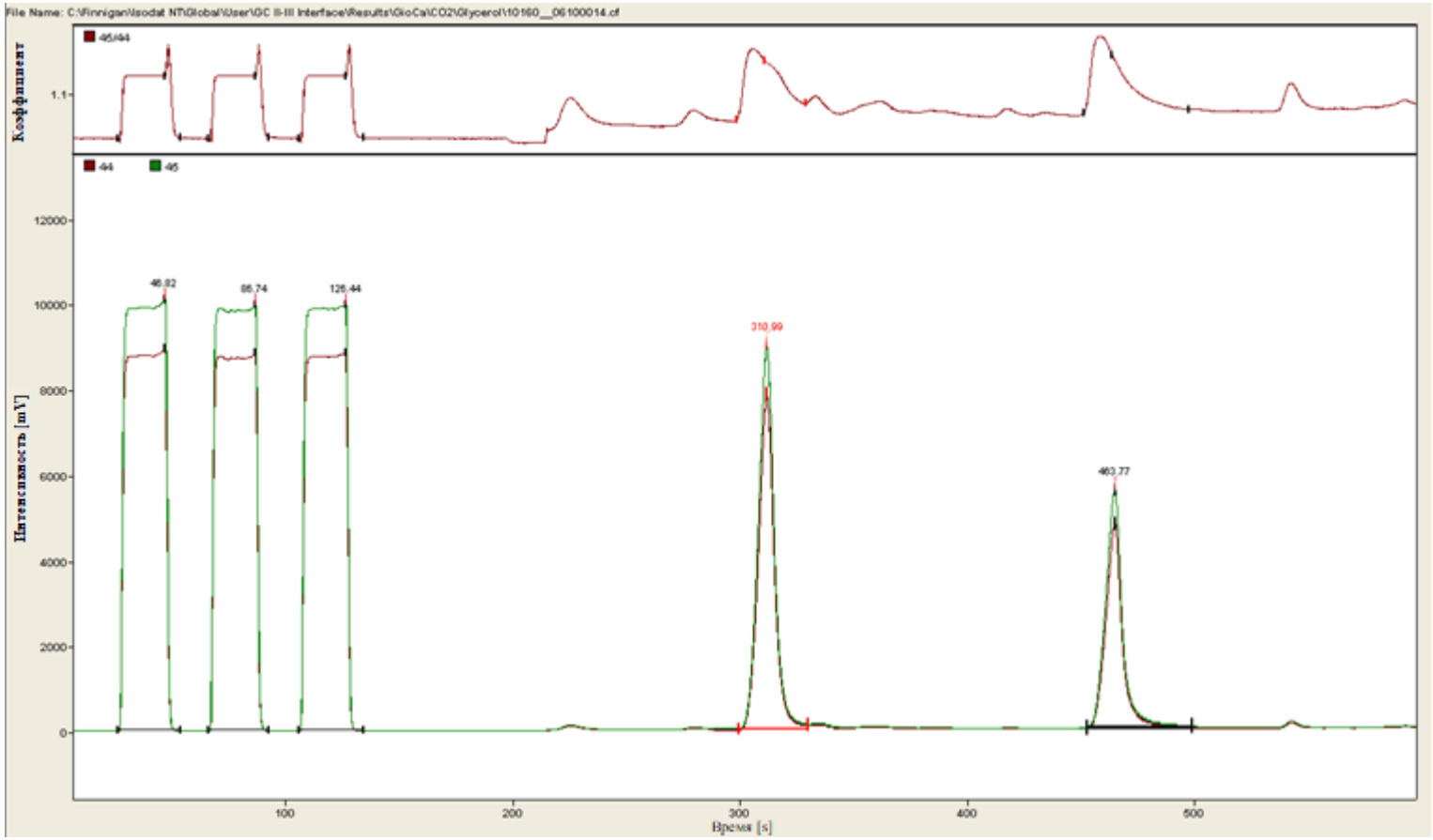
[b]**EA-IRMS глицерин (стандарт) результат: -28.02 ± 0.09 ‰**

Следующие параметры, представленные для определения $\delta^{13}C$ глицерина, были получены из образца вина:

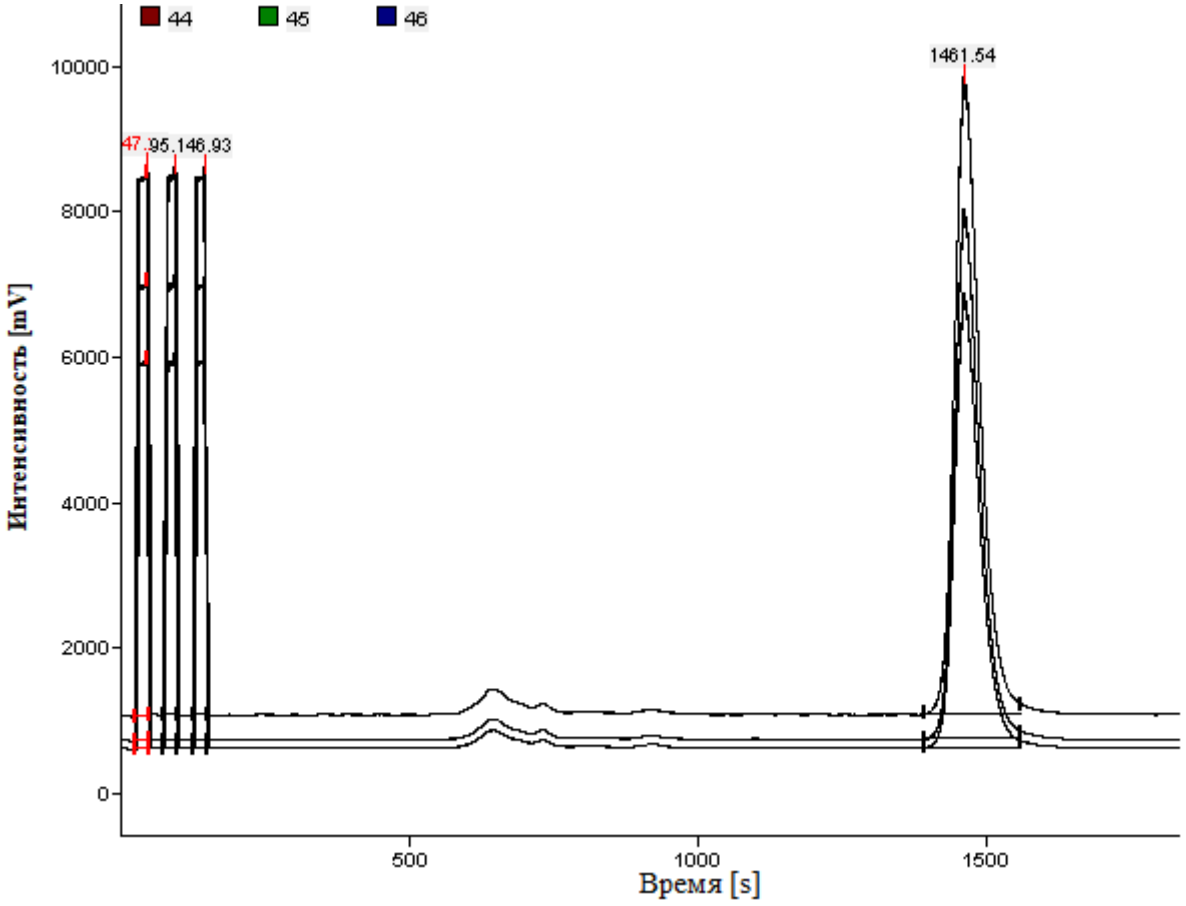
- Повторяемость **r: 0,60 ‰**
- Воспроизводимость **R: 0,62 ‰**

11. ПРИЛОЖЕНИЕ

11.1 Типичная хроматограмма ГХ-C-IRMS анализа глицерина в вине



11.2 Типичная хроматограмма анализа глицерина с помощью ВЭЖХ-IRMS



12. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Calderone G., Naulet N., Guillou C., Reniero F., “Characterization of European wine glycerol: stable carbon isotope approach”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 5902-5906
2. Cabanero AI, Recio JL, Ruperez M. Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry

Метод OIV-MA-AS313-01 Метод I типа

Общая кислотность

1. Терминология

Общая кислотность вина – это сумма его титрируемой кислотности при титровании до уровня pH 7 стандартным щелочным раствором. Диоксид углерода не включается в общую кислотность.

2. Сущность метода

Потенциометрическое титрование или титрование бромтимоловым синим в качестве индикатора и сравнение с конечным цветом стандартного образца.

3. Приборы

3.1 *Ваккумная гидропомпа.*

3.2 *Вакуумные пробирки, 500 мл.*

3.3 *Потенциометр* с градуированной шкалой для измерения значений pH и электродами. Стеклянный электрод должен храниться в дистиллированной воде. Каломель/электрод с насыщенным содержанием хлорида калия должен храниться в насыщенном растворе хлорида калия.

3.4 *Мензурки диаметром 12 см или любой подходящий сосуд*

4. Реактивы

4.1 *Буферный раствор pH 7.0*:

дигидрофосфат калия, KH_2PO_4 ..... 107.3г
раствор гидроксида натрия, NaOH, 1 моль/л …….. 500 мл
вода …..…… 1000 мл

Альтернативой могут быть готовые буферные растворы доступные в продаже.

4.2 Раствор гидроксида натрия, NaOH, 0.1 моль/л.

4.3 Раствор бромтимолового синего индикатора, 4 г/л.

бромтимоловый синий ……..…….. 4 г
нейтральный спирт, 96% (*об/об*) …….. 200 мл

Растворить и добавить:

вода без диоксида углерода CO_2……...200 мл

раствор гидроксида натрия, 1 моль/л, необходимого для получения сине-зеленого цвета (pH 7) ..... 7.5 мл
вода ……...….1000 мл

5. Проведение исследования

5.1 *Подготовка образца:* удаление диоксида углерода.

Налить около 50 мл вина в вакуумную колбу; удалить воду, используя вакуумную помпу в течениие 1-2 минут, непрерывно взбалтывая. Другие системы удаления диоксида углерода CO_2 могут быть использованы в случае гарантированного результата.

5.2 Потенциометрическое титрование

5.2.1 Калибровка pH-метра

Перед использованием измерительный прибор уровня pH калибруется для применения при температуре 20°C, следуя инструкции производителя , буферным раствором pH 7 при температуре 20°C.

5.2.2 Метод измерения

В цилиндрическую мензурку, поместить 10 мл пробы, изготовленной согласно пункту 5.1, при проведении исследования вина и 50 мл при проведении исследования ректификованного концентрированного сусла. Добавить примерно 10 мл дистиллированной воды, а затем раствор гидроксида натрия 0.1 моль/л, в бюретку, пока значение pH не станет равно 7 при 20°C. Гидроксид натрия следует добавлять медленно, непрерывно помешивая раствор. Пусть *n* равен объему миллилитров добавленного гидроксида натрия, 0.1 моль/л.

5.3 *Титрование индикатором (бромтимоловый синий)*

5.3.1 Предварительный тест: определение цвета конечной стадии.

В мензурку (3.4) налить 25 мл прокипяченой дистиллированной воды, 1 мл раствора бромтимолового синего и 10 мл раствора вина, приготовленного, как описано в пункте 5.1, и 50 мл ректификованного концентрированного сусла. Добавить раствор гидроскида натрия, 0.1 моль/л, до получения сине-зеленого цвета. Затем добавить 5 мл буферного раствора pH 7.

5.3.2 Дозировка

Налить в мензурку (3.4) 30 мл прокипяченной дистиллированной воды, 1 мл раствора бромтимолового синего и образец вина, объемом 10 мл, приготовленного, как описано в пункте 5.1, и 50 мл ректификованного концентрированного сусла. Добавить раствор гидроксида натрия, 0.1 моль/л, до получения цвета как в предварительном тесте (5.3.1). Пусть *n* равен объёму миллилитров добавленного раствора гидроксида натрия, 0.1 моль/л.

6. Выражение результатов

6.1 *Метод вычисления*

- Общая кислотность, выраженная в миллиэквивалентах на литр, определяется выражением:

A = 10 *n.*

Записывается с точностью до одного десятичного знака.

- Общая кислотность выраженная в граммах винной кислоты на литр определяется выражением : A' = 0.075 x A
Результат записывается с точностью до двух десятичных знаков после запятой.

- Общая кислотность выраженная в граммах серной кислоты на литр определяется выражением: A' = 0.049 x A
Результат записывается в кавычках до двух знаков после запятой.

6.2 *Повторяемость (r)* титрования в индикаторе:(5.3):

r = 0.9 мэкв/л
r = 0.04 г серная кислота/л
r = 0.07 г винная кислота/л

6.3 *Воспроизводимость (*R*)* титрования в индикаторе (5.3):

Для белых и розовых вин:

R = 3.6 мэкв/л
R = 0.2 гр серная кислота/л
R = 0.3 гр винная кислота/л

Для красных вин:

R = 5.1 мэкв/л
R = 0.3 г серная кислота/л
R = 0.4 г винная кислота/л

БИБЛИОГРАФИЯ

SEMICHON L., FLANZY M., *Ann. Fals. Fraudes*, 1930, **23**,5.
FÉRE L., *Ibid.*, 1931, **24**, 75.
JAULMES P., *Bull. O.I.V.*, 1953, 26, n^{o} 274, 42; *Ann. Fals. Fraudes*, 1955, **48**, 157.

Метод OIV-MA-AS313-02 Метод I типа

Летучая кислотность

1. Терминология

Летучие кислоты составляют кислоты, принадлежащие к уксусному ряду, которые находятся в вине в свободном состоянии и объединенные в виде солей.

2. Сущность метода

Сперва из вина удаляется диоксид углерода. Летучие кислоты отделяют от вина паровой дистилляцией и титруют, используя стандартный гидроксид натрия.

Кислотность свободного и связанного диоксида серы, перегнанного в этих условиях, следует вычесть из кислотности дистиллята.

Кислотность любой сорбиновой кислоты, которая могла быть добавлена в вино, также необходимо вычесть.

Примечание: Часть салициловой кислоты, используемой в некоторых странах для стабилизации вин перед анализом, присутствует в дистилляте. Это должно быть установлено и вычтено. Метод определения описывается в Приложении в данной Главе.

3. Приборы

3.1 Аппарат паровой дистилляции состоит из:

- парогенератора; пар не должен содержать диоксид углерода;
- колбы с паровой трубкой;
- дистилляционной колонки
- конденсатора.

Оборудование должно пройти следующие три тестирования:

(a) Поместить 20 мл прокипяченной воды в колбу. Собрать 250 мл дистиллята и добавить к нему 0.1 мл раствора гидроксида натрия, 0.1 М, и две капли раствора фенолфталеина. Розовый окрас должен быть стабилен на протяжении 10 секунд (т.е.. пар не должен содержать диоксид углерода).

(b) Поместить 20 мл раствора уксусной кислоты, 0.1 М, в колбу. Собрать 250 мл дистиллята. Титровать раствором гидроксида натрия, 0.1 М: объем титра должен составлять не менее 19.9 мл (т.е. не менее 99.5% уксусной кислоты, уносимой с паром).

(c) Поместить 20 мл раствора молочной кислоты, 1 М, в колбу. Собрать 250 мл дистиллята и титровать кислоту раствором гидроксида натрия, 0.1 М.
Добавленный объем раствора гидроксида натрия должен быть меньше или равняться 1.0 мл (т.е. перегоняется не более 0.5% молочной кислоты).

Любой прибор или процесс, который успешно проходит эти тестирования, включается в официальный международный перечень требований к приборам и техническим процессам.

3.2 Водяной вакуумный насос.

3.3 Вакуумная колба.

4. Реактивы

4.1 Винная кислота, кристаллическая.

4.2 Раствор гидроксида натрия, 0.1 М.

4.3 Раствор фенолфталеина, 1%, в нейтральном спирте, 96% (*м/об*).

4.4 Соляная кислота (ρ_{20} = 1.18 до 1.19 г/мл) разбавленная в пропорции 1/4 дистиллированной водой.

4.5 Йодный раствор, 0.005 М.

4.6 Йодистый калий, кристаллический.

4.7 Раствор крахмала, 5 г/л.
Смешать 5 г крахмала и приблизительно 500 мл воды. Довести до кипения, постоянно помешивая и кипятить 10 минут. Добавить 200 г хлорида натрия. Когда раствор остынет, довести объем до одного литра.

4.8 Насыщенный раствор тетрабората натрия, $Na_2B_4O_7.10H_2O$, примерно 55 г/л при температуре 20°C.

4.9 Уксусная кислота, 0.1 М.

4.10 Раствор молочной кислоты, 0.1 М

100 мл молочной кислоты разбавляется 400 мл воды. Раствор нагревается в чаше для выпаривания на кипящей водяной бане в течение четырех часов, время от времени доливая дистиллированную воду. После охлаждения довести объем до литра. Титровать молочную кислоту в 10 мл этого раствора, раствором гидроксида натрия 1 М. Довести раствор до 1 М с помощью молочной кислоты (90 г/л).

5. Проведение исследования

5.1 *Приготовление раствора:* удаление диоксида углерода. Поместить 50 мл вина в вакуумную колбу: создать вакуум в колбе с помощью водяного насоса в течение 1-2 минут постоянно встряхивая. Другие системы устранения диоксида углерода CO_2 могут быть использованы, если устранение диоксида углерода CO_2 гарантировано.

5.2 *Паровая дистилляция*

Поместить в колбу 20 мл вина, освобожденного от диоксида углерода 5.1. Добавить около 0.5 г винной кислоты. Собрать не менее 250 мл дистиллята.

5.3 *Титриметрический анализ*

Титровать раствором гидрохлорида натрия, (4.2), используя две капли фенолфталеина (4.3) в качестве индикатора. Пусть *n* это объем используемого гидроксида натрия.

Добавить четыре капли разбавленной соляной кислоты (4.4), 2 мл раствора крахмала (4.7) и несколько кристаллов йодида калия (4.6). Титровать свободную двуокись серы раствором йода, 0.005 М (4.5). Пусть *n′* выражает используемый объем.

Добавлять насыщенный раствор тетрабората натрия (4.8) до тех пор, пока розовый оттенок не проявится вновь. Титровать объединенный диоксид серы раствором йода, 0.005 М (4.5). Пусть *n″* мл выражает используемый объемом.

6. Выражение результатов

6.1 *Метод вычисления*

Летучая кислота, выраженная в миллиэквивалентах на литр с точностью до одного десятичного знака после запятой, определяется выражением:

$$5\ (n - 0.1\ n' - 0.05\ n'').$$

Летучая кислота, выраженная в граммах серной кислоты на литр с точностью до двух знаков после запятой, определяется выражением:

$$0.245\ (n - 0.1\ n' - 0.05\ n'').$$

Летучая кислотность, выраженная в граммах уксусной кислоты на литр с точностью до двух знаков после запятой, определяется выражением:

$$0.300\ (n - 0.1\ n' - 0.05\ n'').$$

6.2 *Повторяемость (r)* $r = 0.7$ мэкв/л³
$r = 0.03$ гр серная кислота/л
$r = 0.04$ гр уксусная кислота/л.

6.3 *Воспроизводимость* R = 1.3 мэкв/л
R = 0.06 гр серная кислота/л
R = 0.08 гр уксусная кислота/л.

6.4 *Вино с наличием сорбиновой кислоты*

Так как 96% сорбиновой кислоты составляет паровой дистиллят объемом 250 мл, его кислотность должна быть вычтена из летучей кислотности, зная, что 100 мг сорбиновой кислоты соответствует кислотности 0.89 миллиэквивалентов или 0.053 г уксусной кислоты, и зная концентрацию сорбиновой кислоты в мг/л, как определено другими методами.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Определение салициловой кислоты в дистилляте летучих кислот

1. *Сущность метода*

После определения летучей кислотности и поправки на диоксид серы, обнаружено наличие салициловой кислоты, в результате закисления. Фиолетовое окрашивание появляется при добавлении соли железа (III).

Определение салициловой кислоты в дистилляте летучих кислот, проводят на втором дистилляте того же объема, на котором проводилось определение летучих кислот. Сравнительный колометрический метод проводится для определения наличия салициловой кислоты в дистилляте. Его вычитают из летучей кислотности дистиллята.

2 . ***Реактивы***

- Соляная кислота, HCl, (ρ_{20} = 1.18 до 1.19 гр/дм³).
- Раствор тиосульфата натрия, $Na_2S_2O_3.5H_2O$, 0.1 М.
- Раствор сульфата железа аммония (III), $Fe_2(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4.24H_2O$, 10% (*м/об*)
- Раствор салицилата натрия, 0.01 М: содержащий 1.60 г/л салицилат натрия, $NaC_7H_5O_3$.

3. ***Проведение исследования***

3.1 *Идентификация салицилловой кислоты в дистилляте летучих кислот*

Сразу же после определения летучей кислотности и поправки на свободный и связанный диоксид серы, в коническую колбу вносят 0.5 мл соляной кислоты, 3 мл раствора триосульфата натрия, 0.1 М, и 1 мл раствора сульфата железа аммония (III). При наличии салициловой кислоты раствор становится фиолетового цвета.

3.2 *Определение салициловой кислоты*

На конической колбе отмечают объем дистиллята контрольной отметкой. Вылевают дистиллят и споласкивают колбу. Подвергают новую испытуемую пробу вина объемом 20 мл паровой дистилляции и собрать дистиллят в коническую колбу до контрольной отметки. Добавить 0.3 мл концентрированной соляной кислоты и 1 мл раствора сульфата железа аммония (III). Содержимое конической колбы становится фиолетового цвета.

В коническую колбу, идентичную той, которая имеет стандартную маркировку, наливают дистиллированную воду до уровня дистиллята. Добавляют 0.3 мл концентрированной соляной кислоты и 1 мл раствора сульфата железа аммония (III). Из бюретки вливают раствор салицилата натрия, 0.01 М, до получения фиолетового окрашивания такой же интенсивности, как в конической колбе с винным дистиллятом.

Пусть *n'''мл* - объем раствора, добавленного из бюретки.

4. *Коррекция летучей кислотности*

Вычесть объем 0.1 x n'''' мл из объема n мл раствора гидроксида натрия, 0.1 M, используемого для титрования кислотности дистиллята во время определения летучей кислотности.

БИБЛИОГРАФИЯ

Single method: JAULMES P., *Recherches sur l'acidité volatile des vins*, Thèse Diplom. Pharm. 1991, Montpellier, Nîmes.

JAULMES P., *Ann. Fals. Frauds,* 1950, **43**, 110.

JAULMES P., *Analyse des vins*, 1951, 396, Montpellier.

JAULMES P., *Bull. O.I.V.*, 1953., **26**, n^{o} 274, 48.

JAULMES P., MESTRES R., MANDROU Mlle B., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1964, **57**, 119.

Метод OIV-MA-AS313-03 Метод I типа

Фиксированная кислотность

1. Сущность метода

Фиксированная кислотность высчитывается как разница между общей кислотностью и летучей кислотностью.

2. Выражение результатов

Фиксированная кислотность выражена в:

- миллиэквивалентах на литр.
- граммах серной кислоты на литр.
- граммах винной кислоты на литр.

Метод OIV-MA-AS313-04 Метод IV типа

Органические кислоты

Органические кислоты вина могут быть отделены и одновременно определены с помощью Высокоэффективной Жидкостной Хроматографии (ВЭЖХ).

1. Сущность метода

Органические кислоты вина могут быть отделены с использованием стационарных фаз: октилсвязанным диоксидом кремния и колонками с ионообменной смолой. Кислоты выявляются с помощью спектрофотометрического поглощения в ультрафиолете.

Для определения яблочной и винной кислоты, желательно использовать колонку из октилсвязанного диоксида кремния, а для лимонной и молочной кислоты – колонку с ионообменной смолой. Определение этих кислот проводят по внешнему стандарту, анализируемому в аналогичных условиях.

Этот метод также может дать оценку содержания шикимовой, уксусной, янтарной и фумаровой кислот.

Примечание: другие виды колонок могут также хорошо повлиять на разделение. Колонки и условия эксплуатации, приведенные ниже, являются примерами.

2. Аппаратура

2.1. *Прибор с мембранным фильтром* (*диаметр пор: 0.45 мкм*)

2.2. *Картиджи с октадецил-связанным кремнеземом* (*например, Sep Pak - Waters Assoc.*)

2.3. *Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный:*

— 10 мкл петлевым инжектором,
— прибором контроля температуры,
— спектрофотометрическим детектором, способным измерять поглощение при длине волны 210 нм,
— самописцем или интегратором.

Условия эксплуатации

2.3.1 В случае сепарации лимонной, молочной и уксусной кислот:

— колонка с сильной катионообменной смолой (H^+)(300 мм в длину, внутренним диаметром 7.8 мм, 9 мкм размер частицы) (например. HPX-87 H BIO-RAD),
— мобильная фаза: раствор серной кислоты, 0.0125 моль/л,
— поток: 0.6 мл/мин,
— температура: 60 - 65°C. (В зависимости от типа смолы).

2.3.2 В случае отделения фумаровой, янтарной, шикимовой, молочной, яблочной и винной кислот.

- две колонки (250 мм длинной, с внутренним диаметром 4 мм) расположенные последовательно, оснащенные октилсвязанным диоксидом кремния, сферические частицы диаметром 5 мкм,
- мобильная фаза: раствор дигидрофосфата калия, 70 г/л, сульфат аммония, 14 г/л, и отрегулирован до значения pH 2.1 после добавления фосфорной кислоты,
- Поток: 0.8 мл/мин,
- температура: 20°C.

3. Реактивы

3.1. Дистиллированная вода качества ВЭЖХ

3.2. Дистиллированный метанол

3.3. Винная кислота

3.4. Яблочная кислота

3.5. Лактат натрия

3.6. Шикимовая кислота

3.7. Ацетат натрия

3.8. Янтарная кислота

3.9. Лимонная кислота

3.10. Фумаровая кислота

3.11. Серная кислота (ρ_{20} = 1.84 гр/мл)

3.12. Раствор серной кислоты, 0.0125 моль/л

3.13. Дигидроортофосфат калия, KH_2PO_4

3.14. Сульфат аммония, $(NH_4)_2SO_4$

3.15. Орто-фосфорная кислота, 85% (ρ_{20} = 1.71 гр/мл)

3.16. Стандартный раствор: винная кислота, 5 г/л, яблочная кислота, 5 г/л, лактат натрия, 6.22 г/л, шикимовая кислота, 0.05 г/л, ацетат натрия 6.83 г/л, янтарная кислота, 5 г/л, фумаровая кислота, 0.01 г/л и лимонная кислота, 5 г/л.

4. Проведение исследования

4.1. *Подготовка пробы*

Сперва промыть картридж (2.2) 10-ю мл метанола (3.2), затем 10-ю мл воды (3.1).

Удалить газ из вина или пробы сусла. Процедить через мембрану (0.45 мкм) (2.1). Поместить 8 мл профильтрованого стандартного образца в шприц, который уже промыт пробой; проводят через картридж. Слить первые 3 мл и собрать следующие 5 мл (не допускают высыхания картриджа).

4.2. *Хроматография*

Последовательно ввести в хроматограф 10 мкл стандартного раствора и 10 мкл раствора пробы, приготовленного согласно пункту 4.1. Провести данные шаги трижды в том же порядке.

5. Расчеты

5.1. *Качественный анализ*

Определить соответствующее время выдержки для каждого из элюатов.

Органические кислоты стандартного раствора разделены в порядке элюирования ниже:

- лимонная, винная, яблочная, янтарная + шикимовая, молочная, фумаровая и уксусная кислота согласно технике в пункте 2.3.1.
- винная, яблочная, шикимовая, молочная, уксусная, лимонная, янтарная и фумаровая кислоты согласно технике в пункте 2.3.2.

5.2. *Количественный анализ*

Измерить площадь каждого пика и определить среднее значение трех ответов для стандартного раствора и раствора анализируемых проб. Вычесть конценрацию пробы из органических кислот.

6. Выражение результатов

Концентрация выражена следующим образом:

- грамм на литр с точностью до одного десятичного знака для винной, яблочной, молочной и янтарной кислот
- милиграмм на литр для лимонной, уксусной и фумаровой кислот.

БИБЛИОГРАФИЯ

TUSSEAU D. et BENOIT C., *F.V., O.I.V.,* 1986, n^{os} 800 et 813; J. Chromatogr., 1987, **395**, 323-333.

Метод OIV-MA-AS313-05A Метод IV типа

Винная кислота

1. Сущность метода

Винная кислота имеет осадок в виде тартрата кальция и определяется гравиметрическим методом. Это определение выполняется, использованием процедуры сравнения объемов. Условия для появления осадка (pH, общий используемый объем концентрации осаждающихся ионов) являются такими, что вызывают полное осаждение тартрата кальция (±), в то время как тартрат кальция D(-) остается в растворе.

Когда мета-винная кислота была добавлена в вино, что вызвало неполное выпадение осадка тартрата кальция(±), она сперва должна быть гидролизована.

2. Метод

2.1. *Гравиметрический метод*

2.1.1. Реактивы

- Раствор ацетата кальция, содержащий 10 г кальция на литр:

Карбонат кальция, $CaCO_3$ ……..	25 гр
Уксусная кислота, ледяная, CH_3COOH (ρ_{20}= 1.05 гр/мл)……..…	40 мл
Вода ……..	1000 мл

- Тартрат (±)кальция, кристаллизованный: $CaC_4O_6H_4 \cdot 4H_2O$.

Поместить 20 мл L(+) раствора винной кислоты, 5 гр/л, в мензурку объемом 400 мл.

Добавить 20 мл раствора виннокислого аммония D(-), 6.126 г/л, и 6 мл раствора ацетата кальция, содержащего 10 г кальция на литр.

Оставить на два часа до появления осадка. Собрать осадок в тигель из пористого стекла No 4, и промыть трижды 30 мл дистиллированной воды. Высушить в печи до постоянной массы при 70°C. Используя реактивы, указанные в спике выше, получается около 340 мг кристаллизованного тартрата кальция (±). Хранить в закупоренной бутылке.

- Осадочный раствор (pH 4.75):

D(-) тартрат аммония ……..	150 мг
Раствор ацетата кальция, 10 г кальция/л……	8.8 мл
Вода	1000 мл

Растворить аммоний тартрат D(-) в 900 мл воды; добавить 8.8 мл раствора ацетата кальция и довести его до о б ъ е м а 1000 мл. Поскольку тартрат кальция (±)

мало растворим, добавить 5 мг тартрата кальция (±)на литр, помешивать в течение 12 часов и процедить.

Примечание: Осадочный раствор также может быть приготовлен из винной кислоты D(-).

Винная кислота D(±)..... 122 мг
Раствор гидроксида аммония (ρ_{20}= 0.97 г/мл), 25 % (*об/об*) ..... 0.3 мл

Растворить винную кислоту D(-), добавить раствор гидроксида аммония и довести объем примерно до 900 мл; добавить 8.8 мл раствора ацетата кальция, довести объем до литра и отрегулировать уровень pH уксусной кислотой до 4.75. Так как тартрат кальция (±) мало растворим в этом растворе, добавить 5 мг тартрата кальция (±) на литр, помешивать 12 часов и процедить.

2.1.2. Проведение исследования

— Вина без добавления мета-винной кислоты

Поместить 500 мл осадочного раствора и 10 мл вина в 600 мл мензурку. Перемешать и инициировать осаждение, потирая стенки сосуда кончиком стеклянной палочки. Оставить для осаждения на 12 часов (на ночь).

Процедить жидкость и осадить через утяжеленный тигель из спеченного пористого стекла № 4, установленный на чистой вакуумной колбе. Сполоснуть сосуд, где проходило осаждение фильтратом, чтобы убедиться, что весь осадок перемещен.

Сушить до постоянной массы в печи при температуре 70°C. Взвесить. Пусть *p* выражает массу полученного кристаллизованного виннокислого кальция (±), $CaC_4O_6H_4 \cdot 4H_2O$.

— Вина с добавлением мета-винной кислоты.

При анализе вин с добавлением мета-винной кислоты или с возможным добавлением, предварительно эту кислоту гидрализуют следующим образом:

Поместить 10 мл вина и 0.4 мл ледяной уксусной кислоты, CH_3COOH, (ρ_{20}= 1.05 г/мл) в 50 мл коническую колбу. Поместить обратный конденсатор на колбу и кипятить 30 минут. Остудить и затем переместить раствор из конической колбы в мензурку объемом 600 мл. Сполоснуть стакан дважды, используя каждый раз 5 мл воды, а затем продолжить, как описано выше.

Мета-винная кислота подсчитывается и вносится в конечный результат как винная кислота.

2.1.3. Выражение результатов

Одна молекула тартрата кальция (±) соответствует половине молекулы L(+) винной кислоты в вине.

- Количество винной кислоты на литр, выраженное в микроэквивалентах, равняется:

384.5 *p*.

Указывается с точностью до одного десятичного знака.

- Количество винной кислоты в вине на литр, выраженное в граммах винной кислоты, равно: 28.84 *p*.

Указывается с точностью до одного десятичного знака.

- Количество винной кислоты на литр вина, выраженное в граммах виннокислого калия, равно:

36.15 *p*.

Указывается с точностью до одного десятичного знака.

2.2. *Сравнительный анализ объема*

2.2.1. Реактивы

- Соляная кислота (ρ_{20} = 1.18 до 1.19 г/мл) разбавлена в пропорции 1:5 дистиллированной водой

- Раствор ЭДТА, 0.05 М:

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)…… 18.61 г

Вода …… 1000 мл

- Раствор гидроксида натрия, 40% (*м/об*):

Гидроксид натрия, NaOH …….. 40 г
Вода …….. 100 мл

- комплексометрический индикатор: 1% (*м/м*)

2-гидрокси-1-(2-гидрокси-4-сульфо-1-нафтилазо)

-3-нафтоловая кислота …… 1 г
Сульфат натрия, Na_2SO_4 (безводный)…… 100 г

2.2.2.Проведение исследования

После взвешивания, переместить тигель из спеченого стекла, содержащий осадок тартрата кальция (±), на вакуумную колбу и растворить осадок в 10 мл разбавленной соляной кислоты. Промыть тигель из спеченого стекла 50 мл дистиллированной воды.

Добавить 5 мл 40% раствора гидроксида натрия и около 30 мг индикатора. Титровать раствором ЭДТА, 0.05 М.

Пусть количество использованных мл равно *n*.

2.2.3. Выражение результатов

- Количество винной кислоты на литр вина, выраженное в милиэквивалентах, равно: 5 *n.*

Указывается с точностью до одного десятичного знака.

- Количество винной кислоты на литр вина выражается в граммах винной кислоты и равно: 0.375 *n*.

  Указывается с точностью до одного десятичного знака.

- Количество винной кислоты на литр вина выражается в граммах виннокислого калия и равно: 0.470 *n*.

  Указывается с точностью до одного десятичного знака.

БИБЛИОГРАФИЯ

KLING A., *Bull. Soc. Chim*., 1910, **7**, 567.
KLING A., FLORENTIN D., *Ibid*, 1912, **11**, 886.
SEMICHON L., FLANZY M., *Ann. Fals. Fraudes*, 1933, **26**, 404.
PEYNAUD E., *Ibid*, 1936, **29**, 260.
PATO M., *Bull. O.I.V.*, 1944, **17**, n°, 161, 59, n°, 162, 64.
POUX C., *Ann. Fals. Fraudes*, 1949, **42**, 439.
PEYNAUD E., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **18**, 911; *Ref. Z. Lebensmit. Forsch.* , 1953, **97**, 142.
JAULMES P., BRUN Mme S., VASSAL Mlle M., *Trav. Soc, Pharm.*, Montpellier, 1961, **21**, 46-51.
JAULMES P., BRUN Mme S., CABANIS J.C., *Bull. O.I.V.*, 1969, n°s 462-463, 932.

Метод OIV-MA-AS313-05B

Винная кислота

1. Сущность метода

Винная кислота, отделенная с помощью ионнообменной колонки, определяется в элюате колометрическим методом, путем измерения красного окрашивания, возникающего при реакции с ванадиевой кислотой. Элюат также содержит молочную и яблочную кислоты, которые не смешиваются.

ИСКЛЮЧЕН
(постановление Oeno 377/2009)

Метод OIV-MA-AS313-06

Молочная кислота

1. Сущность метода

Молочная кислота, отделенная посредством пропуска через колонку с ионнообменной кислотой, окисляется до ацетальдегида (этанола) и определяется колометрическим методом после реакции с нитропруссидом натрия и пиперидином.

ИСКЛЮЧЕН
(Резолюция 377/2009)

Метод OIV-MA-AS313-07 Метод II типа

Молочная кислота

Ферментативный метод

1. Сущность метода

Общая молочная кислота (L-лактат и D-лактат) окисляется никотинамидаденин динуклеотидом (НАД) до пирувата, в реакции, катализируемой L-лактатдегидрогеназой (L-ЛДГ) и D-лактатдегидрогеназой (D-ЛДГ).

Равновесие реакции обычно больше склоняется в пользу лактата. Удаление пирувата из раствора реакции смещает равновесие в сторону образования пирувата.

При наличии L-глутамата, пируват преобразуется в L-аланин в реакции, катализируемой глутамат пируват трансаминазой (ГПТ):

(1) L-лактат + $НАД^+$ $\xrightleftharpoons{\text{L-ЛДГ}}$ пируват + НАДН + H^+

(2) D-лактат + $НАД^+$ $\xrightleftharpoons{\text{L-ЛДГ}}$ пируват + НАДН + H^+

(3) Пируват + L-глутамат $\xrightleftharpoons{\text{L-ГПТ}}$ L-аланин + α-кетоглутарат

Количество образованного НАДН, измеряется поглощением при длинне волны 340 нм, пропорционально первоначально представленному количеству лактата.

Примечание: L-молочная кислота может быть независимо определена использованием реакций (1) и (3), в то время как D-молочная кислота может быть аналогично определена использованием реакций (2) и (3).

2. Приборы

2.1. Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длине волны 340 нм, длина волны при которой поглощение НАДН максимально.

В противном случае, может использоваться спектрофотометр с источником прерывистого спектра, позволяющий проводить измерения при длинах волн от 334 до 365 нм.

2.2. Стеклянные ячейки с длиной оптического пути 1 см или одноразовые ячейки.

2.3. Микропипетки для забора пробы объемом в диапазоне от 0.02 до 2 мл.

3. Реактивы

Бидистиллированная вода

3.1. Буферный раствор, pH 10 (глицилглицин, 0.6 M; L-глутамат, 0.1 M):

Растворить 4.75 г глицилглицина и 0.88 г L-глютаминовой кислоты в приблизительно 50мл бидистиллированной воды; отрегулировать уровень pH до 10

несколькими милилитрами гидроксида натрия, 10 М, и довести до 60 мл бидистиллированной водой.
Этот раствор будет оставаться стабильным по меньшей мере 12 недель при температуре 4°C.

3.2. Раствор никодинамидадениндинуклеотида (НАД) примерно 40 x 10^{-3} М: растворить 900 мг НАД в 30 мл бидистиллированной воды. Этот раствор будет оставаться стабильным примерно 4 недели при температуре 4°C.

3.3. Суспензия глутамат пируват трансаминазы (ГПТ), 20 мг/мл.
Суспензия остается стабильной около года при температуре 4°C.

3.4. Суспензия L-лактат дегидрогеназа (L-ЛДГ), 5 мг/мл.
Эта суспензия остается стабильной около года при температуре 4°C.

3.5. Раствор D-лактат дегидрогеназы (D-ЛДГ), 5 мг/мл.
Этот раствор остается стабильным около года при температуре 4°C.
Рекомендуется перед определением проверить активность фермента.

Примечание: Все реагенты доступны в продаже.

4. Подготовка образца

Определение лактата проводится непосредственно в вине, без предварительного удаления пигментации (окрашивания) и без разбавления, при условии, что концентрация молочной кислоты менее 100 мг/л. Однако, если концентрация молочной кислоты проходит между:

100 мг/л и 1 г/л, ее разводят в пропорции 1/10 бидистиллированной водой, 1 г/л и 2.5 г/л, разводят в пропорции 1/25 дважды дистиллированной водой, 2.5 г/л и 5 г/л, разводят в пропорции 1/50 бидистиллированной водой.

5. Проведение исследования

Предварительное примечание:

Никакую часть стеклянной емкости, соприкасающейся с раствором, нельзя трогать пальцами, так как это может ввести L-молочную кислоту и таким образом дать ошибочные результаты.

Температура буферного раствора должна быть в диапазоне от 20 до 25°C до проведения измерений.

5.1. *Определение общей молочной кислоты:*

Спектрофотометром, отрегулированным на длину волны 340 нм, определить поглощение, используя 1 см ячейки, с воздухом в качестве стандарта нулевой абсорбции; (нет ячейки на оптическом пути) или с водой в качестве стандарта.
Помещают следующие растворы в 1 см ячейки:

	Стандартная ячейка (мл)	Ячейка с пробой (мл)
Раствор 3.1. ……	1.00	1.00
Раствор 3.2. ……	0.20	0.20
Бидистиллированная вода	1.00	0.80

Суспензия 3.3.	0.02	0.02
Образец измерения	—	0.20

Перемешать, используя стеклянную палочку или палочку из синтетического материала с плоским концом;

Примерно через 5 минут, измерить поглощающую способность в стандартном образце и образце пробы (A_1).

Добавить 0.02 мл раствора 3.4 и 0.05мл раствора 3.5, гомогенизировать, дождаться окончания реакции (около 30 минут) и измерить поглощающую способность растворов в стандартной ячейке и ячейке пробы (A_2).

Вычислить различия (A_2 - A_1) поглощающей способности растворов в стандартной ячейке и ячейке пробы, ΔA_S и ΔA.

В конце вычислить разницу:

$$\Delta A = \Delta A_S - \Delta A_T$$

5.2. *Определение L-молочной кислоты и D-молочной кислоты*

Определение L-молочной кислоты и D-молочной кислоты может быть независимо проведено с помощью процедуры для общей молочной кислоты до определения A_1, а затем продолжая следующим образом:

Добавить 0.02 мл раствора 3.4, гомогенизировать, подождать окончания реакции

(примерно 20 минут) и измерить поглощающую способность растворов в стандартной ячейке и ячейке пробы (A_2).

Добавить 0.05 мл раствора 3.5, гомогенизировать, дождаться окончания реакции

(около 30 минут) и измерить поглощающую способность растворов в стандартной ячейке и в ячейке пробы (A_3).

Подсчитать разницу (A_2 - A_1) L-молочной кислоты и (A_3 - A_2) D-молочной кислоты в стандартном растворе и растворе пробы, ΔA_S and ΔA_T.

В конце вычислить разницу разностей:

$$\Delta A = A_S - \Delta A_T$$

Примечание: Время необходимое для завершения брожения может варьироваться от одной серии к другой. Указанное выше значение дается только для справки, и рекомендуется его определять для каждой серии. Когда проводится определение только L-молочной кислоты, инкубационное время можно сократить до 10 минут.

6. Выражение результатов

Концентрация молочной кислоты представлена в граммах на литр (г/л) до одного десятичного знака.

6.1. *Метод подсчета*

Основная формула расчета концентрации представлена в г/л

где

$$C \quad \frac{V \times PM}{\varepsilon \times \delta \times v \times 1000} \quad \times \Delta A$$

V = объем тестируемого раствора в мл (V = 2.24 мл для L-молочной кислоты, V = 2.29 мл для D-молочной кислоты и общей молочной кислоты
v = объем образца в мл (0.2 мл)
M = молекулярная масса определяемого вещества (для DL-молочной кислоты, M = 90.08)
δ = оптический путь в ячейке (1 см)
ε = коэффициент поглощения НАДН, при длине волны 340 нм
(ε = 6.3 ммоль$^{-1}$ x l x см$^{-1}$).

6.1.1 Общая молочная кислота и D-молочная кислота

$$C = 0.164 \times \Delta A$$

Если раствор был разбавлен во время его приготовления, умножают полученный результат на коэффициент разбавления.

Примечание:

- Измерение при 334 нм: $C = 0.167 \times \Delta A$, ($\varepsilon$ = 6.2 ммоль$^{-1}$ x 1 x см$^{-1}$).
- Измерение при 365 нм: $C = 0.1303 \times \Delta A$, ($\varepsilon$ = 3.4 ммоль$^{-1}$ x 1 x см$^{-1}$).

6.1.2 L-молочная кислота

$$C = 0.160 \times \Delta A$$

Если образец был разбавлен во время его приготовления, умножают результат на коэффициент разбавления.

Примечание:

- Измерение при 334мм: $C = 0.163 \times \Delta A$, ($\varepsilon$ = 6.2 ммоль$^{-1}$ x 1 x см$^{-1}$).
- Измерение при 365 мм: $C = 0.297 \times \Delta A$, ($\varepsilon$ = 3.4 ммоль$^{-1}$ x 1 x см$^{-1}$).

6.2 Повторяемость *(r)*

$$r = 0.02 + 0.07\, x_i$$

x_i = концентрация молочной кислоты в образце г/л

6.3. *Производимость (R)*

$$R = 0.05 + 0.125\, x_i$$

x_i = концентрация молочной кислоты в образце

БИБЛИОГРАФИЯ

HOHORST H.J., in *Méthodes d'analyse enzymatique*, par BERGMEYER H.U., 2e éd., p. 1425, Verlag-Chemie Weinheim/Bergstraße, 1970.
GAWEHN K. et BERGMEYER H.U., ibid., p. 1450.
BOEHRINGER, Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimie alimentaire*, documentation technique.
JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.*, 1974, no 479.
VAN DEN DRIESSCHE S. et THYS L., *F.V., O.I.V.*, 1982, no 755.

Метод OIV-MA-AS313-08 Метод IV типа

Лимонная кислота

Химический метод

1. Сущность метода

Лимонная кислота фиксируется с другими винными кислотами на анионообменной колонку. Цитрамалевую кислоту получают путем фракционирования элюата.

Лимонная кислота окисляется до ацетона, который отделяется дистилляцией. Ацетальдегид (этанол) окисляется до уксусной кислоты, а ацетон определяется йодометрическим методом.

2. Приборы

2.1. *Анионообменная колонка*

В 25 мл бюретку с клапаном, поместить заглушку из стекловаты 20 мл смолы Довекса 1 x 2.

Сначала смола проходит два полных цикла регенерации с попеременным пропусканием раствора соляной кислоты, 1 М, и раствора гидроксида натрия, 1 М. Сполоснуть в 50 мл дистиллированной воды[(1)]. Пропитать смолу ацетат-ионами, добавив 250 мл раствора уксусной кислоты, 4 М. Промыть в 100 мл дистиллированной воды.

Проба проходит через колонку, соответствующую описанию ниже. После элюирования кислот сполоснуть в 50 мл дистиллированной воды и пропитать смолу раствором уксусной кислоты еще раз, 4 М. Сполоснуть в 100 мл воды. Затем смола готова к повторному использованию.

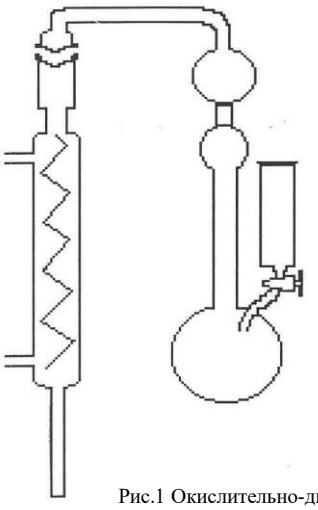


Рис.1 Окислительно-дистилляционный аппарат для определения лимонной кислоты

2.2 *Прибор окисления*

Применение перегонного аппарата с окислительной круглодонной колбой, (см рис.1) облегчает введение перманганата калия с регулярным потоком.

При невозможности использования берут 500 мл круглодонную колбу и воронку, оснащенную с краном с коническим концом,

(1) Прохождение гидроксида натрия вызывает сокращение, во время которого происходит набухание, останавливающее поток. Рекомендовано перемешать смолу как только несколько мл воды проходят через колонку, чтобы предотвратить прилипание смолы ко дну бюретки.

чтобы обеспечить наиболее регулярный поток перманганата калия.

3. Реактивы

- Смола Dowex 1 x 2 (50 - 100 сетка)
- Раствор уксусной кислоты, 4 М
- Раствор уксусной кислоты, 2.5 М
- Раствор гидроксида натрия, 2 М
- Серная кислота (ρ_{20} = 1.84 гр/мл) разведенная $^1/_5$ (об/об)
- Буферный раствор с уровнем pH 3.2 - 3.4

Дигидрофосфат калия KH_2PO_4 …… 150 г
Концентрированная фосфорная кислота (ρ_{20} = 1.70 г/мл) ..... 5 мл
Вода: …… 1000 мл

- Раствор сульфата марганца, $MnSO_4.H_2O$, 50 г/л.
- Пемза
- Раствор перманганата калия, 0.01 М
- Серная кислота (ρ_{20} = 1.84 г/мл) разведенная $^1/_3$ (об/*об*)
- Раствор перманганата калия, 0.4 М
- Сульфат железа (II), $FeSO_4.7H_2O$, 40% (*м/об*)
- Раствор гидроксида натрия, 5 М
- Раствор йода, 0.01 М
- Тиосульфат натрия, 0.02 М
- Тиоден или крахмал

4. Метод

4.1 *Отделение цитрамалевой и лимонной кислоты*

Пропустить 25 мл вина через ионообменную колонку со смолой Dowex 1 x 2 (в ацетатной форме) со скоростью потока 3 мл каждые 2 минуты. Прополоскать колонку три раза в 20 мл дистиллированной воды. Элюировать кислоты в 200 мл раствора уксусной кислоты, 2.5 М, с тем же расходом. Эта фракция элюата содержит янтарную, молочную, галактуроновую, цитрамалевую и почти все яблочные кислоты.

Приступить к элюированию лимонной и винной кислот, пропустив 100 мл раствора гидроксида натрия, 2 М, через колонку. Собрать элюат в колбе для окисления.

4.2. *Окисление*

В колбу, содержащую второй элюат, добавить серную кислоту, разбавленную в пропорции 1/5 (примерно 20мл) чтобы довести уровень pH до промежутка от 3.2 до 3.8. Добавить 25 мл буферного раствора с уровнем pH 3.2-3.4, 1 мл раствора сульфата марганца и несколько зерен пемзы.

Довести до кипения и перегнать более 50 мл, которые отбрасываются.

Поместить раствор перманганата калия, 0.01 М, в воронку и вводить по 1 по одной капле в секунду в кипящий элюат. Дистиллят собирается в 500 мл колбу со стеклянной притертой пробкой, содержащей несколько милилиметров воды. Окисление

продолжается до появления коричневого окраса жидкости, являющегося индикатором избытка перманганата.

4.3. *Отделение ацетона*

Если объем дистиллята менее 90 мл, довести до требуемого объема дистиллированной водой, добавить 4.5 мл разведенной серной кислоты $^1/_3$, и 5 мл раствора перманганата калия, 4.4 M. Если собранный дистиллят значительно превышает объем, довести до 180 мл и удвоить количество реагентов.

В тех условиях (т.е. серная кислота, 0.25 M, и перманганат калия, 0.02 M), ацетальдегид (этанол) окисляется до уксусной кислоты, в то время как ацетон остается нетронутым.

Колбу с пробкой оставляют на 45 минут при комнатной температуре. После чего избыток перманганата калия разрушается после добавления раствора сульфата железа (II). Дистиллировать и собрать около 50 мл дистиллята в колбу с притертой стеклянной пробкой, содержащую 50 мл раствора гидроксида натрия, 5 M.

4.4. *Определение ацетона*

Добавить 25 мл йодного раствора, 0.01 M, в колбу [*]. Оставить на 20 минут. Добавить 8 мл серной кислоты, разведенной в пропорции 1/5. Титровать избыток йода с помощью тиосульфата натрия, 0.02 M, добавив тиоден или крахмал, *n* мл.

При тех же условиях выполнить холостое исследование, заменив 50 мл дистиллята на 50 мл дистиллированной воды.

Используется n′ мл тиосульфата.

5. Расчеты

1 мл йода, 0.01 M, соответствует 0.64 мг лимонной кислоты.

В тех же заданных условиях, количество лимонной кислоты в миллиграммах на литр соответствует:

$$(n' - n) \times 25.6$$

6. Выражение результатов

Концентрация лимонной кислоты выражена в миллиграммах на литр.

[*] Этот объем подходит для содержания лимонной кислоты, не превышающей 0.5 до 0.6 г/л. Для более высокого содержания объем предписанного йодного раствора не достаточен и раствор не приобретает желтый цвет, который является типичным для избытка йода. В этом случае необходимо удвоить или утроить количество йода, пока раствор не станет насыщенного желтого цвета. Однако, в исключительных случаях, где количество лимонной кислоты в вине превышает 1.5 г/л, рекомендуется начать повторное проведение анализа на 10 мл вина.

БИБЛИОГРАФИЯ

KOGEN A., Z. *Anal. chem.*, 1930, **80**, 112. BARTELS W., Z. *Unters. Lebensm*. 1933, **65**, 1.
PEYNAUD E., *Bull. O.I.V.*, 1938, **11**, n^{o} 118, 33.
GODET C., CHARRIERE R., *Trav. Chim. Alim. Hyg*., 1948, **37**, 317.
KOURAKOU Mme S., *Ann. Fals. Exp. Chim*., 1962, **55**, 149.

Метод OIV-MA-AS313-09 Метод II типа

Лимонная кислота

Ферментативный метод

1. Сущность метода

Лимонная кислота преобразуется в оксалоацетат и ацетат в реакции, катализируемой цитрат лиазой (ЦЛ):

$$\text{цитрат} \xrightleftharpoons{\text{ЦЛ}} \text{оксалоацетат} + \text{ацетат}$$

В присутствии малатдегидрогеназы (МДГ) и лактата дегидрогеназы (ЛДГ), оксалоацетат и его декарбоксилирование производно, пируват, сокращены до L-малата и L-лактата с помощью сокращения никотинамидадениндинуклеотида (НАДН):

$$\text{оксалоацетат} + \text{НАДН} + H^+ \xrightleftharpoons{\text{МДГ}} \text{L-малат} + \text{НАД}^+$$

$$\text{пируват} + \text{НАДН} + H^+ \xrightleftharpoons{\text{ЛДГ}} \text{L-лактат} + \text{НАД}^+$$

Количество НАДН, окисленного до НАД+, в этих реакциях пропорционально количеству присутствующего цитрата. Окисление НАДН измеряется в результате снижения абсорбции при длине волны 340 нм.

2. Аппаратура

2.1 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длине волны 340 нм, длина волны при которой поглощение НАДН максимально.

Альтернативно может быть использован спектрофотометр, с источником прерывистого спектра, позволяющий проводить измерения при длине волны 334 нм или 365 нм.

Поскольку речь идет об измерениях абсолютного поглощения (т.е. градуировочные кривые не используются, а стандартизация производится с учетом коэффициента экстинкции НАДН), необходимо проверить шкалы длин волн и спектральное поглощение прибора.

2.2 Стеклянные ячейки с длиной оптического пути 1 см или одноразовые ячейки.

2.3 Микропипетки для объемов в диапазоне от 0.02 до 2 мл.

3. Реактивы

3.1 Буферный раствор с уровнем pH 7.8 (глицилглицин, 0.51 M; pH 7.8; Zn^{+}(0.6 x 10^{-3} M):

растворить 7.13 г глицилглицина приблизительно в 70 мл бидистиллированной воды. Отрегулировать уровень pH до 7.8, добавив приблизительно 13 мл раствора гидроксида натрия, 5 M, добавить 10 мл раствора хлорида цинка, $ZnCl_2$, (80 мг в 100 мл бидистиллированной воды) и довести до 100 мл бидистиллированной водой.

3.2 Уменьшить раствор никотинамидадениндинуклеотида, НАДН, (приблизительно 6 x 10^{-3}M): растворить 30 мг НАДН и 60 мг $NaHCO_3$ в 6 мл бидистиллированной воды.

3.3 Раствор малатдегидрогеназы/лактатдегидрогеназы (МДГ/ЛДГ) (0.5 мг МДГ/мл; 2.5 мг ЛДГ/мл): смешать вместе 0.1 мл МДГ (5 мг МДГ/мл), 0.4 мл раствора сульфата аммония, 3.2 M, и 0.5 мл ЛДГ (5 мг/мл).

Эта суспензия остается стабильной по меньшей мере год при температуре 4°C.

3.4 Цитрат-лиаза (ЦЛ, 5 мг белок/мл): растворить 168 мг лиофилизата в 1 мл ледяной воды. Этот раствор остается стабильным по меньшей мере неделю при температуре 4°C и по меньшей мере 4 недели в замороженом состоянии.

Рекомендуется проверить ферментативную активность перед определением.

3.5 Поливинилполипиролидон (ПВПП).

Примечание: Все реагенты доступны в свободной продаже.

4. Подготовка пробы

Определение цитрата обычно проводится напрямую в вине, без предварительного удаления пигментации (окраски) и без разбавления, при условии, что содержание лимонной кислоты менее 400 мг/л. Если нет, развести вино пока концентрация цитрата не будет в пределах 20 и 400 мг/л (то есть между 5 и 80 мкг цитрата в тестовом образце).

С красными винами, обогащенными фенольными соединениями, рекомендуется предварительная обработка PVPP:

Приготовить суспензию, разведя 0.2 г PVPP в воде, оставить на 15 минут. Процедить с помощью рифленого фильтра.

Поместить 10 мл вина в 50 мл коническую колбу, добавить жидкий PVPP, взятый из фильтра шпателем. Взбалтывать 2-3 минуты. Процедить.

5. Проведение сисследования

Спектрофотометром, отрегулированным на длину волны 340 мм, определить поглощение с помощью ячеек размером 1 см, при этом нулевое поглощение устанавливается по отношению к воздуху (нет ячейки на оптическом пути). Помещают следующие вещества в ячейки размером 1 см:

	Стандартная ячейка (мл)	Ячейка пробы (мл)
Раствор 3.1……	1.00	1.00
Раствор 3.2 ……...	0.10	0.10
Проба для измерения ……	-	0.20
Дважды дистиллированная вода……..	2.00	1.80
Раствор 3.3 ……..	0.02	0.02

Смешать, и приблизительно через 5 минут считать поглощение в растворах в стандартной ячейке и ячейке пробы (A_1).

Добавить:

Раствор 3.4	0.02 мл	0.02 мл

Смешать; дождаться окончания реакции (около 5 минут) и определить поглощение в растворах в стандартной ячейке и ячейке образца (A_2).

Подсчитать разницу поглощения, применив уравнение (A_1 - A_2) в стандартной ячейке и ячейке образца, ΔA_D и ΔA_T.

В конце, вычислить разницу между этими разностями:

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T.$$

Примечание: Время для завершения ферментативной активности может варьироваться от одной партии к другой. Выше приведенное значение дано для справки и его рекомендуется определять для каждой партии.

6. Выражение результатов

Концентрация лимонной кислоты приведена в милиграммах на литр до ближайшего целого числа.

6.1 *Способ вычисления*

Основная формула для вычисления концентрации в мг/л:

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

где:

V = объем тестового раствора в мл (3.14 мл)

v = объем образца в мл (0.2 мл)

M = молекулярная масса вещества для определения
(для безводной лимонной кислоты, M = 192.1)

d = длина оптического пути ячейки в см (1 см)

ε = коэффициент поглощения НАДН, (при 340 нм, ε = 6.3 ммоль$^{-1}$ x l xсм$^{-1}$).

таким образом:

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

Если образец был разведен во время подготовки, умножить результат на коэффициент разбавления.

Примечание:

- При 334 мм: C = 488 x ΔA (ε = 6.3 ммоль$^{-1}$ x l x см$^{-1}$).
- При 365 мм: C = 887 x ΔA (ε = 3.4 ммоль$^{-1}$ x l x см$^{-1}$).

6.2 *Повторяемость (r)*

Концентрация лимонной кислоты менее чем 400 мг/л: *r* = 14 мг/л.

Концентрация лимонной кислоты более чем 400 мг/л: *r* = 28 мг/л.

6.3 *Воспроизводимость(R)*

Концентрация лимонной кислоты менее чем 400 мг/л: *R* = 39 мг/л.

Концентрация лимонной кислоты более чем 400 мг/л: *R* = 65 мг/л.

БИБЛИОГРАФИЯ

MAYER K. et PAUSE G., *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1969. **2**, 143
JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.*, 1970, nº 364
BOEHHRINGER, Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimie alimentaire*, documentation technique.
VAN DEN DREISCHE S. et THYS L., *F.V., O.I.V.*, 1982, nº 755.

Метод OIV-MA-AS313-10 Метод IV типа

Общая яблочная кислота

1. Сущность метода

Яблочная кислота (L-малат), отделенная с помощью анионообменной колонки, определена колориметрическим методом в элюенте, путем измерения желтого окрашивания, которое он образует с помощью хромотроповой кислоты в присутствии концентрированной серной кислоты. Поправка на мешающие вещества производится путем вычитания оптической плотности, полученной после реакции 86% серной и хромотроповой кислоты (яблочная кислота не реагирует при этих концентрациях кислот), из абсорбции, полученной при использовании 96% концентрированных кислот.

2. Приборы

2.1 Стеклянная колонка приблизительно 250 мм в длину и с внутренним диаметром 35 мм, оснащенная сливным краном.

2.2 Стеклянная колонка приблизительно 300 мм в длину и с внутренним диаметром от 10 до 11 мм, оснащенная сливным краном.

2.3 Водяная баня с термостатом в 100°C.

2.4 Набор спектрофотометра для измерения поглощения при длине волны 420 нм, с использованием ячейки с длиной оптического пути в 1 см.

3. Реактивы

3.1 Сильноосновной анионит (например Merck III)

3.2 Гидроксид натрия, 5% (м/*об*).

3.3 Уксусная кислота, 30% (*м/об*).

3.4 Уксусная кислота, 0.5% (*м/об*).

3.5 Раствор сульфата натрия, 10% (*м/об*).

3.6 Концентрированная серная кислота, 95-97% (*м/м*).

3.7 Серная кислота, 86% (*м/м*).

3.8 Хромотроповая кислота, 5% (*м/об*).

Перед каждым определением готовить свежий раствор, растворив 500 мг хромотрофата натрия, $C_{10}H_6Na_2O_8S_2.2H_2O$, в 10 мл дистиллированной воды

3.9 0.5 г DL-яблочной кислоты на литр раствора

Растворить 250 г яблочной кислоты ($C_4H_6O_5$) в растворе сульфата натрия, 10%, чтобы получить 500 мл раствора.

4. Проведение исследования

4.1 *Подготовка ионообменника*

Поместить ватный тампон, пропитанный дистиллированной водой в стеклянную колонку объемом 35 x 250 мм. Залить суспензию из анионообменную смолу в стеклянную колонку. Уровень жидкости должен быть на 50 мм выше смолы. Прополоскать в 1000 мл дистиллированной воды. Промыть колонку 5% раствором гидроксида натрия, дать стечь приблизительно до 2-3 мм над смолой и дважды промыть 5% раствором гидроксида натрия и оставить на 1 час. Промыть колонку 1000мл дистиллированной воды. Повторно заполнить колонку 30% уксусной кислотой, дать стечь примерно до 2-3 мм над поверхностью смолы и затем дважды промыть 30% уксусной кислотой. Оставить по меньшей мере на 24 часа перед использованием. Хранить ионообменную смолу в 30% уксусной кислоте для последующего исследования.

4.2 *Подготовка ионообменной колонки.*

Помещают ватный тампон на дно колонки на высоте 11 x 300 мм над краном. Залить ионообменник, подготовленный по инструкции выше, пункт 4.1, на высоту 10 см. Открыть кран и дать стечь 30% раствору уксусной кислоты приблизительно на 2-3 мм выше поверхности ионообменника. Промыть обменник 50 мл раствора 0.5% уксусной кислоты.

4.3 *Отделение DL-Яблочной кислоты*

Налить на колонку (4.2) 10 мл вина или сусла. Дать стечь по капле (со средней скоростью – одна капля в секунду) и остановить на высоте 2-3 мм выше поверхности смолы. Промыть колонку 50 мл 5% (м/об) уксусной кислоты, затем промыть 50 мл дистиллированной воды и дать стечь с той же скоростью, остановив на высоте 2-3 мм над поверхностью смолы.

Элюируют кислоты, зафиксированные на ионообменнике, 10% раствором сульфата натрия с той же скоростью, что и на предыдущих этапах (1 капля в секунду). Собрать элюат в 100 мл калиброванную колбу. Ионообменная колонка может быть регенерирована с использованием процедуры, описанной в 4.1.

4.4 *Определение яблочной кислоты*

Взять две пробирки 30 мл с широким горлышком, оснащенных стеклянными притертыми пробками A и B. В каждую пробирку добавить 1.0 мл элюента и 1.0 мл 5% раствора хромотрофовой кислоты. Добавить в пробирку A 10.0 мл серной кислоты, 86% (м/*м*), (стандарта), а в пробирку B 10.0 мл серной кислоты, 96% (*м/м*), (проба). Закрыть пробкой и аккуратно взболтать, избегая попадания влаги на стеклянную пробку. Погрузить пробирки в термостат ровно на 10 минут. Охладить пробирки в темноте при 20°C ровно 90 минут. Немедленно измерить поглощение в пробирке B, относительно пробирки с пробой A при длине волны 420 нм в ячейках с оптическим путем 1 см.

Накапать 5, 10, 15 и 20 мл раствора DL-яблочной кислоты (0.5г/л) в отдельные 50 мл объемные колбы. Довести до отметки, 10% раствором сульфата натрия.

Эти растворы соответствуют элюатам, полученным из вин с содержанием 0.5, 1.0, 1.5 и 2.0 г DL-яблочной кислоты на литр.

Продолжить согласно пункту 4.4. График поглощения этих растворов зависит от концентрации яблочной кислоты в них и должен выглядеть как прямая линия, проходящая через начало координат.

Интенсивность окрашивания во многом зависит от концентрации используемой серной кислоты. Необходимо проверить калибровочную кривую, чтобы увидеть изменилась ли концентрация серной кислоты.

5. Выражение результатов

Наносят параметры абсорбции на калибровочный график, чтобы получить содержание DL-яблочной кислоты в граммах на литр. Это содержимое выражается 1 десятичным знаком.

БИБЛИОГРАФИЯ

REINHARD C., KOEDING, G., *Zur Bestimmung der Apfelsäure in Fruchtsäften, Flüssiges Obst.*, 1989, **45**, S, 373 ff.

Метод OIV-MA-AS313-11 Метод II типа

L-Яблочная кислота

1. Сущность метода

L-яблочная кислота (L-малат) окисляется никотинамидаденинди нуклеотидом (НАД) до оксалоацетата в реакции, катализируемой L-малат дегидрогеназой (L-МДГ). Равновесие реакции обычно больше склоняется в пользу малата. Удаление оксалоацетата из реакционной смеси смещает равновесие в сторону образования оксалоацетата.

Из-за наличия L-глутамата, оксалоацетат превращается в L-аспарат, в реакции, катализируемой аспартатаминотрансферазой (АСТ):

(1) L-малат + $НАД^+$ $\overset{\text{L-МДГ}}{\rightleftharpoons}$ оксалоацетат + НАДН + H^+

(2) Оксалоацетат + L-глутамат $\overset{\text{АСТ}}{\rightleftharpoons}$ L-аспарат + α-кетоглутарат

Количество образовавшегося НАДН, измеренное увеличением абсорбции при длине волны 340 нм, пропорционально присутствующему количеству L-малата.

2. Приборы

2.1. Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длине волны 340 нм, при которой поглощение НАДН максимально. В противном случае можно использовать спектрофотометр с источником прерывистого спектра, позволяющим проводить измерения при длине волны 334 или 365 мм.

Поскольку речь идет об абсолютных измерениях поглощения, необходимо проверить шкалы длинн волн и спектральное поглощение прибора (то есть калибровочные кривые не используются, но стандартизация производится с учетом коэффициента экстинкции НАДН).

2.2. Стеклянные ячейки с длиной оптического пути 1 см или одноразовые ячейки.

2.3. Микропипетки для добавления образцов в диапазоне от 0,01 до 2 мл.

3. Реактивы

Бидистиллированная вода

3.1. *Буферный раствор, pH 10*

(глицилглицин 0,6 M; L-глутамат 0,1 M):

растворить 4,75 г глицилглицина и 0,88 г L-глутаминовой кислоты примерно в 50 мл бидистиллированной воды; отрегулировать уровень pH до10, с помощью4,6 мл гидроксида натрия, 10 M, и довести до 60 мл бидистиллированной

воды. Этот раствор будет оставаться стабильным по меньшей мере 12 недель при температуре 4 °C.

3.2. Раствор никотинамидадениндинуклеотида (НАД), приблизительно 47 × 10 3 М: растворить 420 мг НАД в 12 мл в бидистиллированной воде. Этот раствор будет оставаться стабильным по меньшей мере 4 недели при температуре 4 °C.

3.3. Суспензия глутаматоксалоацетаттрансаминазы (ГОТ), 2 мг/мл. Суспензия будет оставаться стабильной по меньшей мере 4 недели при температуре 4 °C.

3.4. Раствор L-малат дегидрогеназы (L-МДГ), 5 мг/мл. Этот раствор остается стабильным по меньшей мере год при температуре 4 °C.

Примечание: Все реактивы перечисленные выше доступны в продаже.

4. Подготовка образца

Определение L-малата обычно проводится непосредственно в вине, без предварительного удаления пигментации (колорации) и без разбавления, при условии, что концентрация L-яблочной кислоты менее 350мг/л (измерено при 365 мг/л). Если это не так, разбавляют вино бидистиллированной водой, пока концентрация L-малата не окажется в диапазоне от 30 до 350 мг/л (таким образом количество L-малата в тестовой пробе оказывается между 3 и 35 мкг).

Если концентрация малата в винах менее чем 30 мг/л, объем тестового образца может быть увеличен до 1 мл. В этом случае, объем добавляемой воды уменьшается таким образом, чтобы суммарные объемы в двух ячейках были равны.

5. Проведение исследования

С помощью спектрофотометра, настроенного на длину волны 340 мм, определить поглощение оптического пути, используя ячейки с длиной оптического пути 1 см, нулевое поглощение регулируется по отношению к воздуху (стандарт) (без ячейки на оптическом пути) или по отношению к воде.

Помещают в ячейки с оптическими путями 1 см:

	Стандартная ячейка (мл)	Ячейка пробы (мл)
Раствор 3.1	1,00	1,00
Раствор 3.2	0,20	0,20
Бидистиллированная вода	1,00	0,90
Суспензия 3.3	0,01	0,01
Проба для измерения	-	0,10

Смешать все вместе; примерно через 30 минут, измерить оптическую плотность растворов в стандартных ячейках и ячейках с пробой (A1).

Добавить:

Раствор 3.4	0,01мл	0,01 мл

Смешивают, дождитесь завершения реакции (около 5-10 минут) и измеряют поглощающую способность растворов в стандартной ячейке и ячейке пробы (A_2).

Вычислить разницу ($A_2 - A_1$) оптической плотности в стандартной ячейке и ячейке пробы, ΔA_D and ΔA_T.

В конце вычислить разницу этих разностей: $\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$

Примечание: Время необходимое для завершения активности фермента, может варьироваться от одной серии к другой. Объем, приведенный выше, дается только для справки и рекомендуется определять его в каждой серии.

.

6. Выражение результатов

Концентрация L-яблочной кислоты дана в граммах на литр до одного десятичного знака.

6.1. *Метод расчета*

$$C \quad \frac{V \times PM}{\varepsilon \times \delta \times 1000} \times \Delta A$$

где:

V = объем тестового раствора в мл (здесь 2,22 мл)

v = объем образца в мл (здесь 0,1 мл)

M = определяемая молекулярная масса вещества (здесь, для L-яблочной кислоты, M=134,09)

$\delta\varepsilon$ = оптический путь в ячейке в см (здесь, 1 см)

ε = коэффициент поглощения НАДН, при 340 нм = 6,3 ммоль $1 \times l \times$ см 1,

как для L-малата :

$$C = 0{,}473 \times \Delta A \text{ г/л}$$

Если проба была разведена во время подготовки, умножить результат на коэффициент разбавления.

Примечание:

- Измерение при 334 нм, ε = 6,2 (ммоль$^{-11}$ x 1 x см^2)
  $C = 0{,}482 \times \Delta A$

- Измерение при 365 нм, ε = 6,2 (ммоль$^{-1\text{-}1}$x 1 x см^2)
  $C = 0{,}876 \times \Delta A$

6.2. *Повторяемость (*r*)*

$$r = 0{,}03 + 0{,}034\ x_i$$

x_i является концентрацией яблочной кислоты в образце в г/л.

6.3. *Воспроизводимость (*R*)*

$$R = 0{,}05 + 0{,}071\ x_i$$

x_i является концентрацией яблочной кислоты в образце в г/л.

БИБЛИОГРАФИЯ

BERGMEYER H.U., *Méthodes d'analyse enzymatique,* 2e éd., Verlag-Chemie Weinheim/Bergstrasse, 1970

BOERHINGER, Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimi alimentaire*, documentation technique.

VAN DEN DRIESSCHE S. et THYS L., F.C. O.I.V., 1982, n° 755

Метод OIV-MA-AS313-12A Метод II типа

D-Яблочная кислота

Ферментативный метод

1. Сущность метода

В присутствии D-малата-дегидрогеназы (D-МДГ) D-яблочная кислота(D-малат) окисляется до оксалоацетата посредством никотинамида-аденина-динуклеотида (НАД). Образованный оксало-ацетат трансформируется в пируват и и диоксид углерода.

(1) D-малат + НАД $\xrightleftharpoons{+\ \text{D-МДГ}}$ пируват + CO_2 + НАДН + H^+

Образование НАДН измеряется увеличением поглощающей способности при длинах волн 334, 340 или 365 нм, которые пропорциональны количеству имеющегося D-малата.

2. Реактивы

Реагенты, позволяющие провести 30 определений, продаются в наборе, которые включают:

1/ Колбу 1 , содержащую около 30 мл раствора буферной кислоты Hepes [N-(2-гидроксиэтил) пиперазин-N' - 2-этансульфокислоту] с уровнем pH = 9.0 и стабилизаторы;

2/ Колбу 2, содержащую около 210 мг лиофилизат НАД;

3/ Колбу 3 (три колбы), содержащую лиофилизат D-МДГ, с титром около 8 ед.

Подготовка растворов

1. Использовать неразведенное содержимое 1 колбы. Довести раствор до температуры 20-25° использованием.
2. Растворить содержимое 2 колбы в 4 мл бидистиллированной воды.
3. Развести содержимое третьей колбы в 0,6 мл бидистиллированной воды. Довести раствор до температуры 20-25 °C перед использованием.

Стабильность растворов

Содержание колбы 1 можно хранить по меньшей мере 1 год при температуре + 4°C; раствор 2 можно хранить в течение 3 недель при температуре + 4 °C и два месяца при температуре - 20 °C; раствор 3 можно хранить при температуре + 4 °C.

3. Приборы

3.1. Спектрофотометр, способный измерять максимальное поглощение НАДН при длине волны 340 нм. Если он недоступен, спектрофотометр с прерывистым источником спектра, позволяющий проводить измерения при длине волны 334 или 365 нм, также может быть использован. Так как используются измерения абсолютной абсорбции (т.е. калибровочные кривые не используются, а стандартизация производится с

учетом коэффициента экстинкции НАДН), следует проверить шкалы длины волны и спектральную абсорбцию прибора.

3.2. Ячейки с оптическим путем 1 см или одноразовые ячейки.

3.3. Микропипетки способные отмерять объемы в диапазоне 0.01 и 2 мл.

4. Подготовка пробы

Анализ D-малата обычно проводится в винах без предварительного обесцвечивания.

Количество D-малата в ячейке должно быть в пределах 2 мкг и 50 мкг; вино должно быть разбавлено так, чтобы концентрация малата была между 0.02 и 0.5 г/л или 0.02 и 0.3 г/л, в зависимости от используемого аппарата.

Таблица разведения:

Расчетное количество малата на литр		Разведение с водой	F фактор разведения
Измеряется при: 340 или 334 нм	365 нм		
< 0.3 г	< 0.5 г	-	1
0.3-3.0 г	0.5-5.0 г	1 + 9	10

5. Проведение исследования

С помощью спектрофотометра, настроенного на длину волны 340 нм, определить поглощение, используя 1 см ячейки, нулевое поглощение регулируется по отношению к воздуху (эталон) или по отношению к воде в качестве стандарта (нет ячейки на оптическом пути).

Помещают следующие вещества в 1 см

	Стандартная ячейка (мл)	Ячейка пробы (мл)
Раствор 1	1.00 мл	1.00 мл
Раствор 2	0.10 мл	0.10 мл
Дважды дистиллированная вода	1.80 мл	1.70 мл
Проба	-	0.10 мл

Перемешать: приблизительно после 6 минут, измерить поглощение стандартного раствора и раствора пробы(A_1).

Добавить

	Стандартная ячейка	Ячейка пробы
Раствор 3	0.05 мл	0.05 мл

Перемешать: подождать окончания реакции (около 20 мин.) и измерить поглощение в стандартном растворе и растворе пробы (A_2).

Определить разность поглощения (A_2 - A_1) стандартного раствора (ΔA_T) и раствора проб (ΔA_D).

Вычесть разницу оптической плотности контрольного образца из разницы оптической плотности пробы:

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

Комментарий: время требуемое для ферментативной реакции может варьироваться от серии к серии. Здесь оно приведено в качестве индикатора. Рекомендуется определять его для каждой серии.

Реакция D-яблочной кислоты происходит быстро. Дополнительная активность фермента также трансформирует L-винную кислоту, хотя и не быстро. По этой причине возникает небольшая побочная реакция, которую можно скорректировать путем экстраполяции (см. приложение 1).

6. Выражение результатов

Концентрация, выраженная, в миллиграммах на литр рассчитывается по главной

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

V = объем теста в мл (здесь 2.95 мл)
v = объем образца в мл (здесь 0.1 мл)
PM = измеряемая молекулярная масса вещества
(здесь, D-яблочная кислота = 134.09)
d = длина оптического пути ячейки (здесь 1 см)
ε = коэффициент поглощения НАДН:
при 340 мм = 6.3 (l ммоль$^{-1}$ см$^{-1}$)
при 365 мм = 3.4 (l ммоль$^{-1}$ см$^{-1}$)
при 334 мм = 6.18(l ммоль$^{-1}$ см^{1}).

Если разбавление было осуществлено во время подготовки образца, умножают результат на коэффициент разбавления. Концентрация D-яблочной кислоты выражена в миллиграммах на литр (мг/л) без десятых чисел.

7. Прецизионность

Подробная информация о межлабораторных испытаниях, касающихся прецизионности метода, кратко изложена в Приложении 2. Производные значения могут быть применимы к диапазонам концентрации аналита и к другим матрицам, отличающимся от указанных в Приложении 2.

7.1. *Повторяемость*

Абсолютная разница между индивидуальными результатми, полученная на идентичном материале, подвергнутом испытанию оператором с использованием того же аппарата, не превышает значения повторяемости r более чем в 5% случаев. Значение: r = 11 мг/л.

7.2. *Воспроизводимость*

Абсолютная разница между отдельными результатами, полученными на идентичном материале, подвергнутом испытанию в двух лабораториях, не превышает значения воспроизводимости R более чем в 5% случаев. Значение: R = 20 мг/л.

8. Комментарии

С учетом точности метода, значения D-яблочной кислоты, составляющей менее 50 мг/л, должны быть подтверждены другим методам анализа, с использованием другого принципа измерения, например по Пшибрскому и др., (1993). Значения D-яблочной кислоты менее 100 мг/л не следует интерпретировать как добавление D, L-яблочной кислоты в вино.

Содержание вина в ячейке не должно превышать 0.1 мл во избежание возможного подавления ферментативной активности полифенолами.

БИБЛИОГРАФИЯ

PRZYBORSKI et al. Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Как исследовать побочные реакции

Побочные реакции, как правило, обусловлены вторичными реакциями фермента в присутствии других ферментов в матрице проб или взаимодействием одного или нескольких элементов матрицы с кофактором ферментативной реакции.

При нормальной реакции поглощение достигает постоянного значения через определенное время, в основном в диапазоне от 10 до 20 минут, согласно скорости спецефической ферментативной реакции. Однако, когда происходит вторичная реакция, поглощение не достигает постоянных значений, но регулярно увеличивается во времени, этот тип процесса называется «побочной реакцией».

Когда возникает эта проблема, следует измерять оптическую плотность раствора через равные промежутки времени (от 2 минут до 5 минут), необходимого стандартному раствору для достижения конечной абсорбционной способности. Когда абсорбция регулярно увеличивается, проводят 5 или 6 измерений, затем устанавливают графическую или расчетную экстраполяцию, чтобы определить, какой была бы абсорбция у раствора при добавлении последнего фермента (T0). Экстраполированная разница оптической плотности в это время, используется для расчета концентрации субстрата.

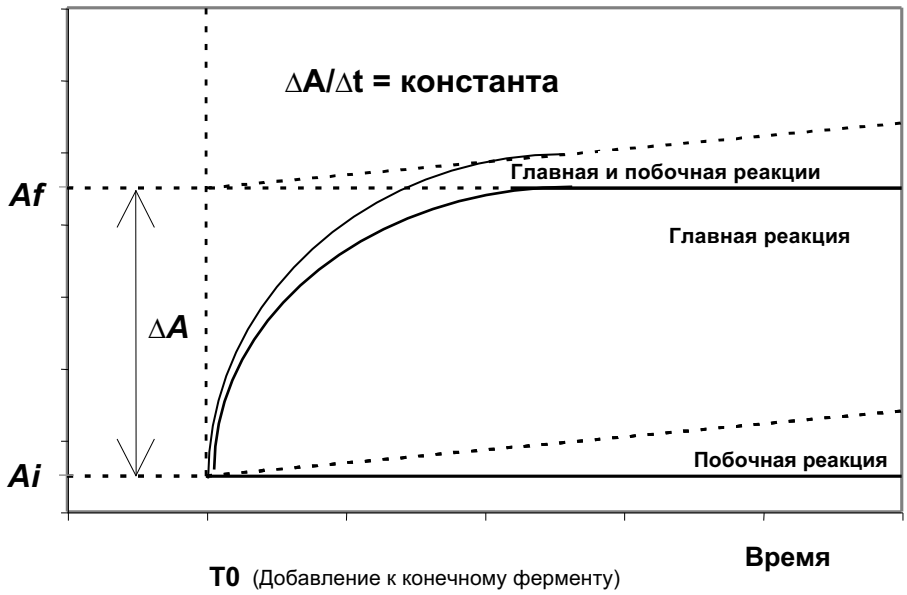


Рисунок 1: Побочная реакция

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Статистические результаты межлабораторных испытаний

Год внутрилабораторного испытания 1995
Количество лабораторий 8
Количество проб 5 с добавлением D-яблочной кислоты

Проба	A	B	C	D	E
Количество лабораторий, оставшихся после ликвидации, дающих неверные результаты	7	8	7	8	7
Количество лабораторий, дающих неверные результаты	1	-	1	-	1
Количество принятых результатов	35	41	35	41	36
Среднее значение($\bar{x}$) (мг/л)	161.7	65.9	33.1	106.9	111.0
Стандартное отклонение повторяемости (s_r) (мг/л)	4.53	4.24	1.93	4.36	4.47
Относительное стандартное отклонение повторяемости (RSD_r) (%)	2.8	6.4	5.8	4.1	4.00
Предел повторяемости (r) (мг/л)	12.7	11.9	5.4	12.2	12.5
Стандартное отклонение воспроизводимости (s_R) (мг/л)	9.26	7.24	5.89	6.36	6.08
Относительное стандратное отклонение воспроизводимости (RSD_R) (%)	5.7	11	17.8	5.9	5.5
Предел воспроизводимости (R) (мг/л)	25.9	20.3	16.5	17.8	17.0

Виды образцов:

A	Красное вино	C	Белое вино
B	Красное вино	D	Белое вино
		E	Белое вино

Метод OIV-MA-AS313-12B Метод IV типа

Определение d-яблочной кислоты в винах с низкой концентрацией ферментативным методом

(Резолюция Oeno 16/2002)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Описанный метод применяется для ферментативного определения D-яблочной кислоты в винах с содержанием ниже 50 мг/л.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Сущность метода основывается на окислении D-яблочной кислоты (+)(D-малат) никотинамидадениндинуклеотидом (НАД) в оксалоацетат, который превращается в пируват и углекислый газ; образование НАДН, измеренное по увеличению поглощения при длине волны 340 нм, пропорционально количеству присутствующего D-малата (сущность метода, описанного для определения D-яблочной кислоты при концентрациях выше 50 мг/л), после введения мерную колбу D-яблочной кислоты, около 50 мг/л.

3. Реагенты

Раствор D-яблочной кислоты с концентрацией 0.199 г/л, помимо реагентов, указанных в методах, описанных для содержания более 50 мг/л.л.

4. Приборы

Приборы, описанные в методе, используются для концентрации свыше 50 мг/л.

5. Подготовка пробы

Подготовка пробы, которая показана в методе, описывается для указанных концентраций свыше 50 мг/л.

6. Проведение исследования

Процедура, которая показана в методе, описывается для концентраций свыше 50 мг/л. (Резолюция Oeno 6/98), в мерную колбу вносится 50 мг/л яблочной кислоты D, эквивалентной 50 мг/л. (Введение 0,025 мл D-яблочной кислоты в объеме 0,199 г/л, заменяя эквивалентным объемом воды); полученные значения уменьшаются до 50 мг/л.

7. ВНУТРЕННЯЯ ПРОВЕРКА

Резюме файла внутренней проверки дозировки D-яблочной кислоты (+)- после добавления 50 мг/л этого изомера

Рабочий уровень	0 мг 70 мг яблочной кислоты D(+)-на литр. В этих пределах, линейный метод с коэффициентом корреляции между 0.990 и 0.994
Установленный лимит	24.4 мг/л
Предел обнаружения	8.3 мг/л
Чувствительность	0.0015 мг/л
Диапазон процентов	87.5 е 115.0% для белых вин и 75 к 105% для красных вин
Повторяемость	=12.4 мг/л для белых вин (в соответствии с методом МОВВ =12,5 мг/л) =12.6 мг/л для красных вин (в соответствии с методом МОВВ=12,7 мг/л)
Процентное стандартное отклонение	4.2% to 7.6% (белые вина и красные вина)
Межлабораторная изменчивость	CV=7.4% (s=4.4 мг/л; X среднее =59.3 мг/л)

8. БИБЛИОГРАФИЯ

Chretien D., Sudraud P., 1993. Présence naturelle d'acide D(+)-malique dans les moûts et les vins, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **27**: 147-149.

Chretien D., Sudraud P., 1994. Présence naturelle d'acide D(+)-malique dans les moûts et les vins, *Feuillet Vert de l'OIB,* 966.

Delfini C., Gaetano G., Gaia P., Piangerelli M.G., Cocito C., 1995. Production of D(+)-malic acid by wine yeasts, *Rivista de Viticoltura e di Enologia*, 48: 75-76.

OIB, 1998. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.Mise à jour Septembre 1998.* OIB, Paris.

Przyborski H., Wacha C., Bandion F., 1993. Zur bestimmung von D(+)Apfelsäure in wein, *Mitteilung Klosterneuburg*, 43: 215-218.

Machado M. and Curvelo-Garcia A.S., 1999; FV.O.I.V. N° 1082, Ref. 2616/220199.

Метод OIV-MA-AS313-13A Метод IV типа

L-Аскорбиновая кислота

(Постановление Oeno 377/2009)

1. Сущность метода

Следующие методы позволяют определить наличие L-аскорбиновой кислоты и дегидроаскорбиновой кислоты в вине или сусле.

Аскорбиновая кислота превращается на активированном угле в дегидроаскорбиновую кислоту. Последняя образует флуоресцентное соединение при взаимодействии с ортофенилендиамином (OPDA). Контрольный результат, приготовленный в присутствии борной кислоты, позволяет определить ложную флуоресценцию (путем образования комплекса борной кислоты/дегидроаскорбиновой кислоты). Образец и контрольный результат анализируют флуорометрическим методом и рассчитывают концентрацию дегидроаскорбиновой кислоты.

2. Метод (флюометрический метод)

2.1 *Приборы*

2.1.1 Флюорометр.

Спектрофлуориметр, оснащенный лампой с непрерывным спектром, используется на минимальной мощности.

Оптимальные длины волн возбуждения и излучения во время испытания, должны быть определены заранее и зависят от используемого оборудования. Ориентировочно, длина волны возбуждения будет приблизительно 350 нм, а длина волны излучения приблизительно 430 нм. Ячейки с длиной оптического пути 1 см.

2.1.2 Фильтр из спеченного стекла с пористостью 3.

2.1.3 Тестовые пробирки (диаметр примерно 10 мм).

2.1.4 Приборы для взбалтывания пробирок (палочки для перемешивания)

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Раствор ортофенилендиамина дигидрохлорида ($C_6H_{10}Cl_2N_2$), 0.02 % (*м/об*), приготовленный перед применением.

2.2.2 Раствор тригидрата ацетата натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$), 500 г/л.

2.2.3 Смешать растворы борной кислоты и ацетата натрия:

Растворить 3 г борной кислоты, (H_3BO_3 в 100 мл раствора ацетата натрия 500 г/л. Раствор должен быть приготовлен перед применением.

2.2.4 Раствор уксусной кислоты (CH_3COOH) 56%: ледяная уксусная кислота (ρ_{20}= 1.05 г/мл), разбавленная до 56% (*об/об*), уровень pH приблизительно 1.2.

2.2.5 L-Стандартный раствор аскорбиновой кислоты, 1 г/л.

Прямо перед использованием, растворить 50 мг L-аскорбиновой кислоты предварительно дегидрированной в испарителе, избегая попадания света на нее, в 50 мл раствора уксусной кислоты (2.2.4).

2.2.6 Активированный уголь для анализов.

Поместить 100 г активированного угля в 2-литровую коническую колбу и добавить 500 мл водного раствора соляной кислоты, 10% (*об/об*), (ρ_{20}= 1.19 г/л). Довести до кипения и процедить через спеченный стеклянный фильтр пористости 3. Собирают обработанный таким образом уголь в 2-литровую коническую колбу. Добавляют 1 л воды, встряхивают и фильтруют через фильтр из пористого стекла с пористостью 3. Повторяют эту операцию еще два раза. Помещают остаток в печь, нагретую до 115°C ± 5°C на 12 часов (или на ночь).

2.3 *Проведение исследования*

2.3.1 Подготовка образца вина или сусла

Взять 100 мл вина или сусла и развести в мерной колбе с раствором уксусной кислоты, 56% (2.2.4), для получения раствора с концентрацией аскорбиновой кислоты от 0 до 60 мг/л. Тщательно перемешивают содержимое колбы встряхиванием. Добавляют 2г активированного угля и дают постоять 15 минут, периодически встряхивая. Фильтруют с помощью обычного бумажного фильтра, отбрасывая первые несколько миллилитров фильтрата.

Пипеткой вносят по 5 мл фильтрата в две градуированные колбы вместимостью 100 мл. Добавить в первую колбу 5 мл смешанного раствора борной кислоты и раствора ацетата натрия (2.2.3) (контрольный образец) и во вторую колбу 5 мл раствора ацетата натрия (2.2.2) (проба). Дать постоять 15 минут, периодически помешивая. Довести до 100 мл дистиллированной водой. Пипеткой отобрать по 2 мл содержимого каждой колбы в пробирку и добавить 5 мл раствора ортофенилендиамина. Перемешивают палочкой и дают реакции протекать в течение 30 минут в темноте, а затем проводят спектрофлуориметрические измерения.

2.3.2.*Подготовка калибровочной кривой*.

В три градуированные колбы 100 мл накапать 2, 4, и 6 мл соответствующего стандартного раствора аскорбиновой кислоты (2.2.5), с помощью раствора уксусной кислоты довести до 100 мл и тщательно перемешать. Стандартные растворы, приготовленные таким образом, содержат 2, 4 и 6 мг на 100 мл L-аскорбиновой кислоты соответственно.

Добавить 2 г активированного угля в каждую колбу и дать отстояться 15 минут, периодически помешивая. Отфильтровать через обычный бумажный фильтр, слив несколько милилитров. Накапать пипеткой 5 мл каждого фильтрата в 100 мл градуированные колбы (первая серия). Повторить процесс и получить вторую серию трех градуированных колб. В каждую колбу из первой серии

добавить 5 мл раствора борной кислоты и ацетата натрия (2.2.3), а в каждую колбу из второй серии добавить 5 мл раствора ацетата натрия (2.2.2). Оставить на 15 минут, периодически помешивать. Довести до 100 мл дистиллированной водой. Взять 2 мл содержимого из каждой колбы; добавить 5 мл раствора ортофенилендиамина. Перемешать и оставить в темном месте на 30 минут до окончания реакции, а затем провести спектрофлуориметрические измерения.

2.3.3 Люминесцентное определение

Установить ноль на шкале измерений с помощью соответствующей контрольной пробы для каждого раствора. Измерить интенсивность для каждого раствора в диапазоне калибровки для определяемого раствора. Построить калибровочную кривую, которая должна быть прямой линией, проходящей через начало координат. По графику определяют концентрацию C в аскорбиновой кислоте и дегидроаскорбиновой кислоты в анализируемом растворе.

2.4 *Выражение результатов*

Концентрация L-аскорбиновой кислоты и дегидроаскорбиновой кислоты в вине в милиграммах на литр дается с помощью выражения:

$$C \times F$$

где F является

БИБЛИОГРАФИЯ

AFNOR standard, 76-107, ARNOR, Tour Europe, Paris.
PROM T., *F.V., O.I.V*., 1984, n° 788.

Метод OIV-AS313-13B Метод IV типа

L-Аскорбиновая кислота

(Постановление Oeno 377/2009)

ИСКЛЮЧЕН

Метод OIV-AS313-13B Метод IV типа

Сорбиновая кислота

1. Сущность метода

Определение с помощью ультрафиолетовой абсорбционной спектрофотометрии

Сорбиновую кислоту (транс, транс, 2,4-гексадиеновая кислота), экстрагированную перегонкой с водяным паром, определяют в винном дистилляте методом ультрафиолетовой абсорбционной спектрофотометрии. Вещества, мешающие измерению поглощения в ультрафиолете, удаляют выпариванием, с использованием слабощелочного раствора гидроксида кальция. Образцы с концентрацией менее 20 мг/л подтверждаются с помощью тонкослойной хроматографии (чувствительность: 1 мг/л).

2. Определение с помощью спектрофотометрии поглощения ультрафиолетового излучения

2.1 *Приборы*

2.1.1 Аппарат для паровой дистилляции (см. главу «Летучие кислоты»)

2.1.2 Водяная баня 100 °C

2.1.3 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения поглощения при длине волны 256 нм и имеющий кварцевую кювету с оптическим путем 1 см

2.2 *Реагенты*

2.2.1 Кристаллическая винная кислота

2.2.2 Раствор гидроксида кальция,

2.2.3 0,02 М Стандартный раствор сорбиновой кислоты, 20 мг/л:

Растворяют 20 мг сорбиновой кислоты примерно в 2 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия.

Перелевают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят до необходимого объема водой. В качестве альтернативы растворяют 26,8 мг сорбата калия $C_6H_7KO_2$ в воде и доводят водой до 1 л.

2.3 Проведение исследования

2.3.1 Дистилляция

В барботер парового перегонного аппарата помещают 10 мл вина и добавляют около 1 г винной кислоты. Собирают 250 мл дистиллята.

2.3.2 Подготовка калибровочной кривой

Готовят путем разведения стандартного раствора (2.2.3) водой четыре разбавленных стандартных раствора, содержащих 0,5, 1,0, 2,5 и 5 мг сорбиновой кислоты на литр.

Метод MOBB-MA-AS313-14A **Метод типа IV**

Сорбиновая кислота

1. Сущность метода

Определение с помощью ультрафиолетовой абсорбционной спектрофотомерии

Сорбиновая кислота (транс, транс, 2,4-гексадиеновая кислота), экстрагированная перегонкой с паром определяется в винном дистилляте методом ультрафиолетовой абсорбционной спектрофотомерии. Вещества, которые мешают измерению поглощения в ультрафиолете, удаляют выпариванием досуха с использованием слабощелочного раствора гидроокиси кальция. Пробы с концентрацией менее 20 мг/л подтверждаются с помощью тонкослойной хроматографии (чувствительность: 1 мг/л).

Определение с помощью абсорбционной спектрофотомерии в ультрафиолетовой области.

2.1 Устройство
2.1.1 Аппарат для паровой дистилляции (см. главу "Летучая кислотность")
2.1.2 Водяная баня 100 °C
2.1.3 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения поглощения при длине волны 256 нм и имеющий кварцевую ячейку с оптическим путем 1 см.

2.2 Реагенты
2.2.1 Кристаллическая винная кислота
2.2.2 Раствор гидроксида кальция, приблизительно 0,02 M
2.2.3 Стандартный раствор сорбиновой кислоты, 20 мг/л:
Растворяют 20 мг сорбиновой кислоты примерно в 2 мл 0,1 M раствора гидроксида натрия. Наливают в мерную колбу объемом 1 л и доливают воды. В качестве альтернативы растворяют 26,8 мг сорбата калия $C_6H_7KO_2$ в воде и доводят до объема 1 литр.
2.3 Проведение исследования
2.3.1 Дистилляция
Помещают 10 мл вина в барботер аппарата для паровой дистилляции и добавляют примерно 1 г винной кислоты. Собирают 250 мл дистиллята.
2.3.2 Подготовка калибровочной кривой

Готовят путем разбавления стандартного раствора (2.2.3) водой четыре разбавленных стандартных раствора, содержащих 0,5, 1,0, 2,5 и 5 мг сорбиновой кислоты на литр.

Измеряют их поглощение с помощью спектрофотометра при 256 нм, используя дистиллированную воду в качестве образца. Строят кривую, показывающую изменение поглощения в зависимости от концентрации. Взаимосвязь является линейной.

2.3.3 Определение

Помещают 5 мл дистиллята в испарительную чашу диаметром 55 мм, добавляют 1 мл раствора гидроксида кальция (2.2.2). Выпаривают досуха на кипящей водяной бане. Растворяют остаток в нескольких мл дистиллированной воды, полностью переливают в мерную колбу объемом 20 мл и доводят до объема промывочной водой. Измеряют поглощение при 256 нм, используя раствор, полученный путем разбавления 1 мл раствора гидроксида кальция на 20 мл воды в качестве заготовки. Наносят значение поглощения на калибровочную кривую и на основе этого считывают концентрацию *C* сорбиновой кислоты в растворе.

Примечание: В данном методе потери из-за испарения незначительны, и поглощение измеряется на обработанном дистилляте, разбавленном на 1/4 дистиллированной водой.

2.4 Выражение результатов

2.4.1 Расчет

Концентрация сорбиновой кислоты в вине, выраженная в мг/л, определяется:

$100 \times C$

Где *C* = концентрация сорбиновой кислоты в растворе, полученном в 2.3.3, выраженная в мг/л.

БИБЛИОГРАФИЯ

JAULMES P., MESTRES R. & MANDROU B., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* n° spécial, réunion de Marseille, 1961, 111-116.

MANDROU, B., BRUN, S. & ROUX E., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1975, 725, 29-48.

CHRETIEN D., PEREZ L. & SUDRAUD P.*, F.V., O.I.V.,* 1980, n° 720

Метод OIV-MA-AS313-14B **Метод IV типа**

Сорбиновая кислота

1. Сущность метода

Определение методом газовой хроматографии
Сорбиновую кислоту, экстрагированную в диэтиловом эфире, определяют методом газовой хроматографии с использованием метода внутреннего стандарта.

2. Определение методом газовой хроматографии

2.1 Оборудование
2.1.1. Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и колонкой из нержавеющей стали (4 м x 1/8 дюйма), предварительно обработанной диметилдихлорсиланом и заполненной неподвижной фазой, состоящей из смеси сукцината диэтиленгликоля, 5%, и фосфорной кислоты, 1%, (DEGS - H_3PO_4), или из смеси адипата диэтиленгликоля, 7%, и фосфорной кислоты, 1%, (DEGA - H_3PO_4), связанной на сетке Gaschrom Q 80-100.
Обработка колонки диметилдихлорсиланом (DMDCS): пропускают раствор, содержащий 2-3г (DMDCS) в толуоле, через колонку. Незамедлительно промыть метанолом, затем азотом, а затем промыть гексаном с последующим добавлением большего количества азота. Теперь колонка готова к упаковке.

Условия эксплуатации:
- Температура духовки: 175 °C
- Температура инжектора и детектора: 230 °C.
- Газ-носитель: азот (скорость потока = 200 мл/мин)

Примечание: Другие типы колонок также могут обеспечить хорошее разделение, особенно
капиллярные колонки (например, FFAP). В качестве примера приведен описанный ниже метод работы.

2.1.2 Микроцилиндр емкостью 10 мкл, градуированный по 0,1 мкл

2.2 Реагенты
2.2.1 Диэтиловый эфир, дистиллированный непосредственно перед использованием.

2.2.2 Внутренний стандарт: раствор ундекановой кислоты, $C_{11}H_{22}O_2$, 1 г/л в этаноле, 95% (объем компонента к общему объему).

2.2.3. Водный раствор серной кислоты, H_2SO_4, (ρ_{20} = 1,84 г/мл), разбавленный на 1/3 (объем компонента к общему объему).

2.3 Проведение исследования

2.3.1 Подготовка образца для анализа

В стеклянную пробирку емкостью примерно 40 мл, снабженную притёртой пробкой, помещают 20 мл вина, 2 мл внутреннего стандарта (2.2.2) и 1 мл разбавленной серной кислоты.

После смешивания раствора путем многократного переворачивания пробирки добавляют 10 мл диэтилового эфира (2.2.1). Извлекают сорбиновую кислоту в органическую фазу, встряхивая пробирку в течение пяти минут. Дают отстояться.

2.3.2 Подготовка образца раствора с добавкой

Выбирают вино, для которого хроматограмма эфирного экстракта не показывает пика, соответствующего элюированию сорбиновой кислоты. Укрепляют данное вино сорбиновой кислотой в концентрации 100 мг/л. Обрабатывают 20 мл образца, приготовленного таким образом, в соответствии с процедурой, описанной в 2.3.1.

2.3.3. Хроматография

В хроматограф с использованием микроцилиндра вводят 2 мкл фазы эфирного экстракта, полученные в 2.3.2, затем 2 мкл фазы эфирного экстракта, полученные в 2.3.1.

Записывают соответствующие хроматограммы: проверяют идентичность соответствующих времен удерживания сорбиновой кислоты и внутреннего стандарта. Измеряют высоту (или площадь) каждого из зарегистрированных пиков.

2.4 Выражение результатов

2.4.1 Расчет

Концентрация сорбиновой кислоты в анализируемом вине, выраженная в мг/л, определяется по следующей формуле:

$$100\ x = \frac{h}{H}\ x\ \frac{I}{i}$$

где

H = высота пика сорбиновой кислоты в растворе с добавкой

h = высота пика сорбиновой кислоты в образце для анализа

I = высота внутреннего стандартного пика в растворе с добавкой

i = высота внутреннего стандартного пика в образце для анализа

Примечание: Концентрация сорбиновой кислоты может быть определена таким же образом на основе измерений соответствующих областей пиков.

БИБЛИОГРАФИЯ

JAULMES P., MESTRES R. & MANDROU B., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, n° spécial, réunion de Marseille, 1961, 111-116.
MANDROU, B., BRUN, S. & ROUX E., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1975, 725, 29-48.
CHRETIEN D., PEREZ L. & SUDRAUD P., F.V., O.I.V., 1980, n° 720

Метод OIV-MA-AS313-14C **Метод IV типа**

Сорбиновая кислота

1. Сущность метода

Идентификация следов методом тонкослойной хроматографии

Сорбиновую кислоту, экстрагированную в этиловом эфире, отделяют методом тонкослойной хроматографии и в половину количественного соотношения оценивают ее концентрацию.

2. Идентификация следов сорбиновой кислоты методом тонкослойной хроматографии

2.1 Оборудование

2.1.1 Предварительно покрытые полиамидным гелем (толщиной 0,15 мм) с добавлением индикатора флуоресценции пластины размером 20 x 20 см для тонкослойной хроматографии

2.1.2 Камера для тонкослойной хроматографии

2.1.3 Микропипетка или микроцилиндр для подачи объемов 5 мкл с точностью ± 0,1 мкл

2.1.4 Ультрафиолетовая лампа (254 нм)

2.2. Реагенты

2.2.1 Диэтиловый эфир, $(C_2H_5)_2$ O

2.2.2 Водный раствор серной кислоты: серная кислота (ρ_{20}= 1,84 г/мл), разбавленная 1/3 (объем компонента к общему объему)

2.2.3 Стандартный раствор сорбиновой кислоты, приблизительно 20 мг/л, в 10% (объем компонента к общему объему) смесь этанола и воды.

4.2.4 Подвижная фаза: гексан + пентан + уксусная кислота (20:20:3).

2.3 Проведение исследования

2.3.1 Подготовка образца для анализа

В стеклянную пробирку емкостью примерно 25 мл, снабженную пробкой из матового стекла, наливают 10 мл вина; добавляют 1 мл разбавленной серной кислоты (2.2.2) и 5 мл диэтилового эфира (2.2.1). Перемешивают, многократно переворачивая пробирку. Дают отстояться.

2.3.2 Приготовление разбавленных стандартных растворов

Готовят пять разбавленных стандартных растворов из раствора, указанного в пункте 2.2.3, содержащего 2, 4, 6, 8 и 10 мг сорбиновой кислоты на литр.

2.3.3 Хроматография

Используя микрошприц или микропипетку, наносят 5 мкл экстрагированной эфиром фазы, полученной в 2.3.1 и 5 мкл каждого из разбавленных стандартных растворов (2.3.2) в точках 2 см от нижнего края пластины и на расстоянии 2 см друг от друга. Помещают подвижную фазу в резервуар хроматографа на высоту около 0,5 см и дают атмосфере в резервуаре наполниться парами растворителя. Помещают тарелку в резервуар. Дают хроматограмме проявиться на расстоянии от 12 до 15 см (время проявления примерно 30 минут). Высушивают пластину в потоке прохладного воздуха. Изучают хроматограмму под ультрафиолетовой лампой с длиной волны 254 нм.

Пятна, указывающие на присутствие сорбиновой кислоты, будут казаться темно-фиолетовыми на
желтом флуоресцентном фоне пластины.

2.4 Выражение результатов

Сравнение интенсивности пятен, образованных тестируемым образцом и стандартными растворами, позволит провести оценку в половину количественного соотношения концентрации аскорбиновой кислоты в диапазоне от 2 до 10 мг/л. Концентрация, равная 1 мг/л, может быть определена с использованием образца объемом 10 мкл.
Концентрации выше 10 мг/л могут быть определены с использованием объема пробы менее 5 мкл (измеряется с помощью микроцилиндра).

БИБЛИОГРАФИЯ

JAULMES P., MESTRES R. & MANDROU B., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, n° spécial, réunion de Marseille, 1961, 111-116.
MANDROU, B., BRUN, S. & ROUX E., *Ann. Fals. Exp. Chim*., 1975, 725, 29-48.
CHRETIEN D., PEREZ L. & SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1980, n° 720

Метод OIV-MA-AS313-15 **Метод I типа**

pH (A31, Oeno 438-2011)

1. Сущность метода

Измеряется разность потенциалов между двумя электродами, погруженными в исследуемую жидкость. Один из этих двух электродов имеет потенциал, который зависит от уровня pH жидкости, в то время как другой имеет фиксированный и известный потенциал и представляет
собой электрод для сравнения.

2. Оборудование

2.1 pH-метр со шкалой, откалиброванной в единицах pH и позволяющей проводить измерения
с точностью не менее ±0,01 единиц pH.

2.2 Электроды:

- стеклянный электрод, выдержанный в дистиллированной воде;
- электрод сравнения, насыщенный каломелем хлорида калия, выдержанный в насыщенном растворе хлорида калия; или
- комбинированный электрод, выдержанный в дистиллированной воде.

3. Реагенты

Буферные растворы:

- Насыщенный раствор тартрата водорода калия, содержащий 5,7 г/л тартрата водорода калия ($CO_2HC_2H_4O_2CO_2K$) при 20°C. (Этот раствор можно хранить до двух месяцев, добавляя 0,1 г тимола на 200 мл).

$$\text{pH} \begin{cases} 3.57 \text{ at } 20^0 \text{ C} \\ 3.56 \text{ at } 25^0 \text{ C} \\ 3.55 \text{ at } 30^0 \text{ C} \end{cases}$$

- Раствор фталата водорода калия, 0,05 M, содержащий 10,211 г/л фталата водорода калия, $CO_2HC_6H_4CO_2K$, при 20°C. (Этот раствор может храниться до двух месяцев.)

$$\text{pH} \begin{cases} 3.999 \text{ at } 15^0 \text{ C} \\ 4.003 \text{ at } 20^0 \text{ C} \\ 4.008 \text{ at } 25^0 \text{ C} \\ 4.015 \text{ at } 30^0 \text{ C} \end{cases}$$

Раствор, содержащий:

*ди*гидрофосфат калия, KH_2PO_4 ..... 3.402 г

*ди*калия гидрофосфат, K_2HPO_4 ..... 4.354 г

вода ..... 1 л

(Этот раствор может храниться до двух месяцев)

pH
- 6.90 at 15 o C
- 6.88 at 20 o C
- 6.86 at 25 o C
- 6.85 at 30 o C

Примечание: могут использоваться коммерческие эталонные буферные растворы, прослеживаемые до СИ.

Например: pH 1.679 ±0.01 at 25°C

pH 4.005 ±0.01 at 25°C

pH 7.000 ±0.01 at 25°C

4. Проведение исследования

4.1 Обнуление устройства

Обнуление выполняется перед выполнением любого измерения в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к используемому прибору.

4.2 Калибровка pH-метра

pH-метр должен быть откалиброван при 20°C с использованием стандартных буферных растворов, подключенных к СИ. Выбранные значения pH должны охватывать диапазон значений, которые могут встречаться в сусле и винах. Если используемый pH-метр несовместим с калибровкой при достаточно низких значениях, может быть использована проверка с использованием стандартного буферного раствора, связанного с СИ и имеющего значение pH, близкое к значениям, встречающимся в сусле и винах.

4.3 Определение

Погружают электрод в анализируемый образец раствора, температура которого должна быть от 20 до 25°C и как можно ближе к 20°C. Считывают значение pH непосредственно со шкалы. Проводят по крайней мере два теста на одном и том же образце. Конечный результат принимается за среднее арифметическое двух определений.

5. Выражение результатов

Значение pH сусла или вина указывается с точностью до двух знаков после запятой.

Метод OIV-MA-AS313-16 **Метод IV типа**

Определение органических кислот и минеральных анионов в винах методом ионной хроматографии (Резолюция Oeno 23/2004)

Преамбула

Развитие высокоэффективной ионной хроматографии в лабораториях позволило изучить определение органических кислот и минеральных анионов в алкогольных и безалкогольных напитках с помощью этого метода. В частности, что касается анализа вин, результаты сравнительных испытаний и измерения скорости извлечения позволили нам подтвердить
аналитическую методологию.

Основной интерес этого метода заключается в том, что ионообменные колонки позволяют отделять большинство органических кислот и анионов, а обнаружение с помощью кондуктометрии

освобождает анализ от помех из-за присутствия фенольных соединений. Этот тип помех очень заметен в хроматографических методах, которые включают детектирование в ультрафиолетовом излучении при 210 нм.

1 - ОБЪЕКТ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Этот метод определения минеральных анионов и органических кислот методом ионной хроматографии применим к алкогольным напиткам (винам, крепким спиртным напиткам и ликерам). Он позволяет определять органические кислоты в диапазонах концентраций, перечисленных в таблице 1; эти концентрации получены путем разбавления образцов.

Таблица 1: диапазон концентраций анионов для их анализа методом ионной хроматографии

Сульфаты	от 0,1 до 10	мг/л
Ортофосфат	от 0,2 до 10	мг/л
Яблочная кислота	от 1 до 20	мг/л
Винная кислота	от 1 до 20	мг/л
Лимонная кислота	от 1 до 20	мг/л
Изоцитриновая кислота	от 0.5 до 5	мг/л

Диапазоны вышеупомянутой работы приведены в качестве примера. Они включают в себя общепринятые методы калибровки и поэтому могут быть адаптированы

в зависимости от типа используемого устройства (тип колонки, чувствительность детектора и т.д.) и процедуры (объем вводимой пробы, разбавление и т.д.)

2- СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Разделение минеральных и органических анионов на ионообменной смоле.
Обнаружение с помощью кондуктометрии.
Идентификация по истечении времени хранения и количественная оценка с использованием калибровочной кривой.

3 - РЕАГЕНТЫ

Все реагенты, используемые во время анализа, должны быть соответствующего качества.
Вода, используемая для приготовления растворов, должна быть дистиллированной или деионизированной водой с проводимостью менее 0,06 µS, свободной от анионов, определяемых на порогах, совместимых с пределами обнаружения используемого устройства.

3.1 Элюент

Состав элюента зависит от характера разделительной колонки и характера анализируемой пробы. Тем не менее, его всегда готовят с использованием водных растворов гидроксида натрия.
Результаты хроматографического анализа чередуются с карбонизацией раствора гидроксида натрия; следовательно, колбы с подвижной фазой перед добавлением гидроксида натрия промывают гелием, и следует принять все меры предосторожности, чтобы избежать загрязнения их воздухом помещения.
Наконец, будут использоваться коммерческие концентрированные растворы гидроксида натрия.
Замечание
В таблице в главе 9 упоминаются основные помехи, которые могут присутствовать в образцах.
Поэтому необходимо заранее знать, взаимодействуют ли они с определяемыми ионами и присутствуют ли они в такой концентрации, чтобы нарушить испытания.
Ферментированные напитки содержат янтарную кислоту, которая может повлиять на определение яблочной кислоты. С этой целью необходимо добавить метанол в элюент, чтобы улучшить разрешающую способность колонки для этих двух веществ (20% метанола).

3.2 Калибровочные эталонные растворы

Готовят калибровочные эталонные растворы с точными концентрациями, близкими к указанным в следующей таблице. Растворяют в воде, некотором количестве соли или в соответствующих кислотах в мерных колбах объемом 1000 мл. (Таблица 2)

Таблица 2: Концентрация анионов, определенная в калибровочных эталонных растворах

Анионы и кислоты	Взвешенные вещества	Итоговая концентрация (мг/л)	Количество по весу (мг)
сульфаты	Na2SO4	500	739.5
ортофосфат	KH2PO4	700	1003.1
яблочная кислота	Malic acid	1000	1000.0
винная кислота	Tartaric acid	1000	1000.0
лимонная кислота	Citric acid, H2O	1000	1093.8
изолимонная кислота	Isocitrate 3Na, 2H2O	400	612.4

Примечание
Лаборатория должна принять необходимые меры предосторожности в отношении гигроскопичности свойств некоторых солей.

3.3 Калибровочные растворы

Калибровочные растворы получают разбавлением эталонных растворов с содержанием ионов или кислот в воде.
Эти растворы должны содержать все ионы или кислоты, определяемые в диапазоне концентрации, охватывающие те, которые соответствуют анализируемым образцам. Они должны быть подготовлены в день использования.
Необходимо проанализировать не менее двух калибровочных растворов и контрольный образец, чтобы установить для каждого вещества калибровочные кривые по трем точкам (0, максимальная полуконцентрация, максимальная концентрация).
Примечание
В табл. 1 приведены данные о максимальных концентрациях анионов и кислот в калибровочных растворах, но характеристики хроматографических колонок лучше с очень разбавленными растворами.
Таким образом, необходимо найти наилучшее возможное соответствие между производительностью колонки и уровнем разбавления образцов.

Как правило, образец разбавляют максимум в 50–200 раз, за исключением редких случаев.

Для продления срока службы разбавленных растворов предпочтительно готовить их в растворе вода/метанол (80/20).

4 - ОБОРУДОВАНИЕ

4.1 Система приборов для ионной хроматографии, включающая:
4.1.1 Резервуар(ы) для элюента
4.1.2 Насос с постоянным ходом, без пульсации
4.1.3 Инжектор, ручной или автоматический, с петлевым пробоотборным клапаном (например,
25 или 50 мкм).
4.1.4 Разделительные колонки
Система, состоит из анионообменной колонки контролируемой производительности, возможно, предколонка того же типа, что и основная колонка. Например, можно использовать колонки AS11 и предколонку DIONEX® AG11.

4.1.5 Система обнаружения

Циркуляционную ячейку проводимости очень малого объема подключают к кондуктометру
с несколькими диапазонами чувствительности. Для снижения проводимости элюента применяют механизм химического подавления, катионообменник установлен перед кондуктометрической ячейкой.
4.1.6 Регистратор, интегратор или другие устройства для обработки сигналов.

4.2 Точный баланс до 1 мг

4.3 Колбы мерные вместимостью от 10 до 1000 мл

4.4 Калиброванные пипетки от 1 до 50 мл

4.5 Фильтрующие мембраны со средним диаметром пор 0,45 мкм.

5 - ОТБОР ПРОБ

Образцы разбавляются с учетом того, что необходимо определить присутствие минеральных анионов и органических соединений кислот.
Если их концентрация в образце очень изменчива, два уровня разбавления будут эффективны.
необходимо для соблюдения диапазонов концентраций, охватываемых калибровкой решения.

6-ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Включают устройство, учитывая инструкции производителей.

Регулируют накачку (поток элюента) и условия обнаружения таким образом, чтобы получить хорошее разделение пиков в диапазоне концентраций анализируемых ионов.

Дают системе выровняться до тех пор, пока не будет достигнута стабильная базовая линия.

6.1 Калибровка

Готовят калибровочные растворы, как указано в 3.3.

Вводят калибровочные растворы таким образом, чтобы вводимый объем как минимум в 5 раз превышал объем калибровочной петли для промывки системы.

Прослеживают калибровочные кривые для каждого иона. В норме они должны быть прямыми.

6.2 Контрольный эксперимент

Вводят воду, используемую для приготовления калибровочных растворов и образцов.

Контролируют отсутствие пиков и количественно определяют присутствующие минеральных анионов (хлориды, сульфаты и др.).

6.3 Анализ

Образец разбавляют, возможно, на двух разных уровнях, как указано в 5, чтобы анионы и кислоты, которые необходимо определить, присутствовали в диапазоне концентраций калибровочных растворов.

Фильтруют разбавленный образец через фильтрующую мембрану (4.5) перед введением.

Затем выполняют калибровку (6.1).

7 - Сходимость и воспроизводимость.

Этот метод был протестирован в межлабораторном цикле, но не является официальной проверкой в соответствии с протоколом OIV (Oeno 6/99).

Предел сходимости и предел воспроизводимости для определения каждого иона вина были рассчитаны в соответствии со стандартом ISO 5725.

Каждый анализ повторяли 3 раза.

Количество участвующих лабораторий: 11; Результаты были следующими:

Белое вино

	Номер	Средний показатель (мг/л)	Сходимость (мг/л)	Воспроизводимость (мг/л)
яблочная кислота	11/11	2745	110	559
лимонная кислота	9/11	124	13	37
винная кислота	10/11	2001	96	527
сульфат	10/11	253	15	43
О. фосфат	9/11	57	5	18

Красное вино

	Номер	Средний показатель (мг/л)	Сходимость (мг/л)	Воспроизводимость (мг/л)
яблочная кислота	8/11	128	16	99
лимонная кислота	8/10	117	8	44
винная кислота	9/11	2154	48	393
сульфат	10/11	324	17	85
О. фосфат	10/11	269	38	46

8 - РАСЧЕТ СКОРОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

Дополненный образец - белое вино.

Определение	Номер	Начальная концентрация (г/л)	Присоединение (г/л)	Присоединение (хроматогр.) (г/л)	Скорость восстановления (г/л)
лимонная кислота	11/11	122	25.8	24.2	93.8
яблочная кислота	11/11	2746	600	577	96.2
винная кислота	11/11	2018	401	366	91.3

9 - РИСКИ хроматографической интерференции

Любое вещество, время удерживания которого совпадает со временем удерживания одного из анализируемых ионов, может представлять собой помеху.

Наиболее распространенные помехи включают следующее:

Анионы	Или интерференты, соли
Соль азотной кислоты (нитраты)	Бромиды
Сульфаты	Оксалаты, малеаты
Ортофосфат	Фталаты
Яблочная кислота	Янтарная, цитрамалевая кислота
Винная кислота	Малоновая кислота
Лимонная кислота	-
Изолимонная кислота	-

Примечание: Добавление метанола в подвижную фазу может решить некоторые аналитические проблемы.

Метод OIV-MA-AS313-17 **Метод II типа**

Определение шикимовой кислоты в вине

методом ВЭЖХ и УФ-детекции

(Резолюция Oeno 33/2004)

1. ВВЕДЕНИЕ

Шикимовая кислота (3,4,5-тригидрокси-1-циклогексен-1-карбоновая кислота) биосинтетически синтезируется из хиновой кислоты путем дегидратации и играет важную роль в качестве предшественника фенилаланина, тирозина, триптофана и растительных алкалоидов [1]. В качестве второстепенной карбоновой кислоты шикимовая кислота естественным образом содержится в широком спектре фруктов [2].

Государствам-членам рекомендуется продолжать исследования в этой области, чтобы избежать любой ненаучной оценки результатов.

Этот метод был подтвержден в международном совместном исследовании с помощью анализа образцов вина с естественным содержанием шикимовой кислоты в диапазоне от 10 до 150 мг/л. Достоверность была доказана межлабораторным сравнением с использованием ВЭЖХ и GC/FID и GC/MS соответственно [3].

2. ЗАДАЧА

В этой статье описывается изократический рутинный метод количественного определения шикимовой кислоты в красном, розовом и белом вине (включая игристые и специальные вина) при уровнях концентрации от 1 мг/л до 300 мг/л методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Когда этот метод применяется к игристому вину, образцы должны быть предварительно дегазированы (например, с помощью ультразвука).

3. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Шикимовую кислоту определяют непосредственно без предварительной подготовки образца методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием системы соединенных колонок. На первом этапе органические кислоты в вине предварительно разделяются с помощью колонки с обращенной фазой C18, за которой следует колонна катионообмена при 65° C, выполняющая функцию окончательного разделения. При использовании слегка подкисленной воды в качестве растворителя для элюирования достигается базовое разрешение шикимовой кислоты без каких-либо помех со стороны матрицы вина. Благодаря двойной связи в циклогексановой кольцевой системе

шикимовая кислота обладает сильным поглощением и поэтому может быть легко обнаружена с помощью УФ-детектора при максимуме поглощения при 210 нм.

4. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

4.1 Шикимовая кислота (CAS 138-59-0), чистота не менее 98%
4.2 Серная кислота 0,5 М
4.3 Дистиллированная вода
4.4 Приготовление элюирующего растворителя (0,01 М H_2SO_4)
Пипеткой 20 мл 1 н. серной кислоты (4.2) в мерную колбу объемом 1000 мл, наполняют бидистиллированной водой (4.3) примерно до 900 мл, встряхивают и доводят до 1000 мл.
Фильтруют растворитель для элюирования фильтром с размером пор меньше или равным 0,45 мкм и дегазируют.
Приготовление стандартного исходного раствора (500 мг/л шикимовой кислоты)
Взвешивают ровно 50 мг шикимовой кислоты (4.1), переносят их без потерь в 100 мл мерную колбу, наполняют бидистиллированной водой (4,3) примерно до 90 мл, встряхивают и доводят до 100 мл. При температуре ±18°C стандартный раствор может храниться месяцами.
4.6 Подготовка рабочих стандартных растворов (5 , 25 , 50 , 100, 150 мг/л шикимовой кислоты) Исходный раствор 500 мг/л (4,5) разбавляют соответствующим образом бидистиллированной водой (4,3), чтобы получить пять рабочих стандартов 5 , 25 , 50 , 100, 150 мг/л шикимовой кислоты. Рабочие растворы готовят ежедневно.

5. ОБОРУДОВАНИЕ

Обычное лабораторное оборудование, в частности, следующее:

5.1 Система ВЭЖХ, способная достигать полного разделения пиковшикимовой кислоты.
5.1.1 Высокоэффективный жидкостный хроматограф с шестиступенчатым инжекционным клапаном, оснащенным контуром объемом 5 мкл, или любым другим устройством, автоматическим или ручным, для надежного впрыска микрообъемов.
5.1.2 Изократическая насосная система, позволяющая с большой точностью достигать и поддерживать постоянную или запрограммированную скорость потока.
5.1.3 Колонный нагреватель, позволяющий нагревать 300-миллиметровую колонну до 65 °C.
5.1.4 Детектор UV-VIS с проточной ячейкой и набором длин волн 210 нм.
5.1.5 Вычислительный интегратор или другая система сбора данных.
5.2 Колонная система ВЭЖХ из нержавеющей стали
5.2.1 Охранная колонна
Рекомендуется установить подходящую предварительную колонку перед системой аналитических колонок

5.2.2 Аналитическая система колонок

Колонка с обратной фазой (окружающая среда)
Материал: нержавеющая сталь
Внутренний диаметр: 4 - 4,6 мм
Длина: 200-250 мм
Неподвижная фаза: сферический материал с обращенной фазой C18, частицы диаметром 5 мкм*)
в сочетании с катионообменной колонкой (нагретой до 65°C)
Материал: нержавеющая сталь
Внутренний диаметр: 4 - 7,8 мм
Длина: 300 мм
Стационарная фаза: Сульфированная стерен-дивинилбензольная гелевая смола (S-DVB), содержащая водородную упаковку, имеющую сетчатую структуру 8 %**

6. ОТБОР ПРОБ

Прозрачными образцами заполняют непосредственно флаконы для образцов и передают на

хроматографию без какой-либо подготовки образца. Мутные образцы вина перед впрыском фильтруются через мембранный фильтр 0,45 мкм, при том что первые фракции фильтратов отбраковываются.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1 Условия эксплуатации ВЭЖХ-анализа

Вводят 5 мкл вина в хроматографический аппарат с помощью системы впрыска с полным контуром.
Скорость потока: 0,4 мл/мин (если внутренний диаметр катионообменной колонки составляет 4 мм)
0,6 мл/мин (если внутренний диаметр катионообменной колонки составляет 7,8 мм)
Подвижная фаза: 0,01 M H_2SO_4
Колонный нагреватель для катионообменной колонны: 65°
Время выполнения: 40 мин

---

*) *) LichrospherTM 100 RP-18 , HypersilTM-ODS или OmnichromTM YMC-ODS-A являются примерами подходящих колонок, доступных в продаже

**) **) AminexTM HPX 87-H или RezexTM ROA-Органическая кислота являются примерами подходящих колонок, доступных в продаже

Время уравновешивания: 20 мин (для обеспечения полного элюирования всех веществ из винной матрицы)

Длина волны обнаружения: 210 нм

Объем инъекции: 5 мкл

Примечание: Из-за отличных разделительных свойств различных колонок и отличных мертвых объемов различного оборудования для ВЭЖХ абсолютное время удерживания (мин) для пика шикимовой кислоты может варьироваться более или менее значительно. Несмотря на то, что шикимовую кислоту можно легко идентифицировать, рассчитав относительную задержку (r), связанную с эталонным пиком, где винная кислота является основной органической кислотой, естественным образом содержащейся в вине, и это первый и доминирующий пик на хроматограмме. Попробовав разные столбцы с обратной фазой C18 и для различных катионообменных колонок было рассчитано относительное удержание (r) 1,33 (± 0,2).

7.2. Предел обнаружения

Предел обнаружения этого метода, рассчитанный в соответствии с протоколом OIV, был оценен в 1 мг/л.

8. РАСЧЕТ

Готовят 5-точечную калибровочную кривую на основе рабочих стандартных растворов (4.6).

В соответствии с методом внешнего стандарта количественное определение шикимовой кислоты выполняется путем измерения площадей пиков при времени удерживания шикимовой кислоты и сравнения их с соответствующей калибровочной кривой. Результаты выражены в мг/л шикимовой кислоты с 1 знаком после запятой.

9. ПРЕЦИЗИОННОСТЬ

Метод был протестирован в ходе совместного исследования с участием 19 международных

лабораторий. Разработка и оценка в соответствии с O.I.V. Резолюцией Oeno 33/2004 «Протокол валидации и методов анализа». Исследование включало 5 различных образцов красных и белых вин. Образцы охватывали уровни концентрации от 10 до 120 мг/л (см. приложение 3).

Стандартные отклонения повторяемости и воспроизводимости коррелировали с концентрацией шикимовой кислоты (см. Приложение 2). Фактические параметры производительности могут быть рассчитаны с помощью

$$s_r = 0{,}0146 \cdot x + 0{,}2716$$

$$s_R = 0{,}0286 \cdot x + 1{,}4883$$

x:

концентрация шикимовой кислоты (мг/л)

Пример:

шикимовая кислота: 50 мг/л

$s_r = \pm 1{,}0$ мг/л

$s_R = \pm 2{,}92$ мг/л

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

Типичное отделение шикимовой кислоты от других органических кислот в вине приведено в Приложении 1.

Взаимосвязь концентрации шикимовой кислоты и стандартного отклонения повторяемости и воспроизводимости приведена в Приложении 2.

Статистические данные, полученные по результатам межлабораторного исследования, приведены в приложении 3.

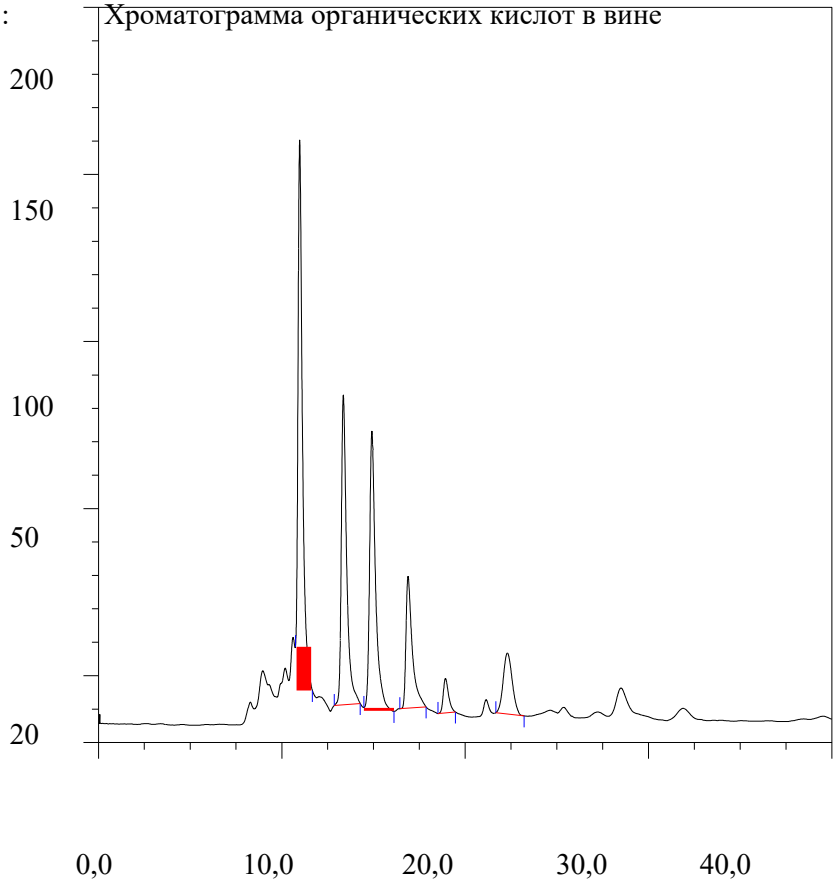
11. БИБЛИОГРАФИЯ

[1] Römpp Lexikon Chemie-Version 2.0, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag 1999

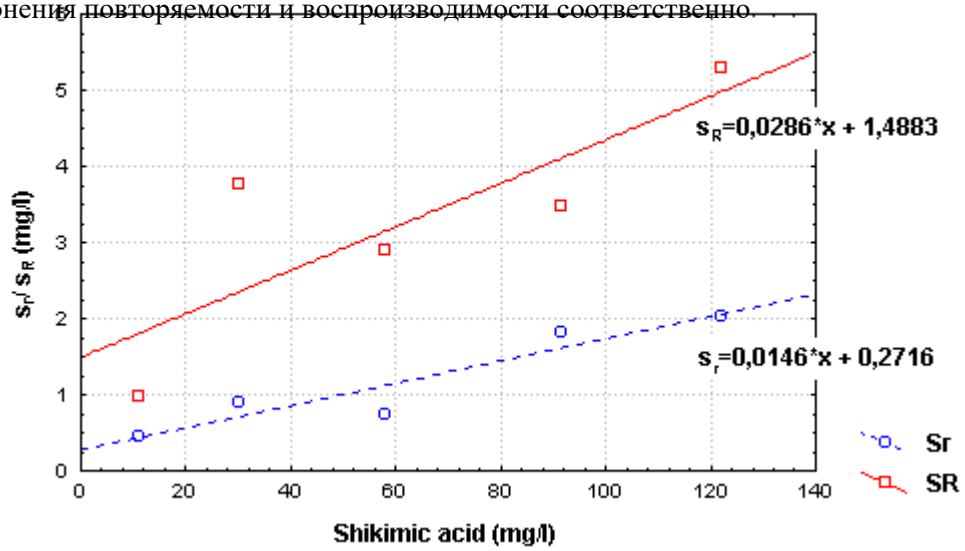
[2] Wallrauch S., Flüssiges Obst 3, 107 ± 113 (1999)

[3] 44th Session SCMA, 23-26 march 2004, Comparison of HPLC-, GCand GC-MS-Determination of Shikimic Acid in Wine, FV 119

Приложение 1: Хроматограмма органических кислот в вине



Приложение 2: Взаимосвязь концентрации шикимовой кислоты и стандартного отклонения повторяемости и воспроизводимости соответственно.



Приложение 3: Таблица рабочих параметров метода

идентификация образца	A	B	C	D	E
Количество участвующих лабораторий	19	19	19	19	19
Количество принятых лабораторий	17	18	17	18	18
значение	58.15	30.05	11.17	122.17	91.20
s_r^2	0.54588	0.84694	0.19353	4.32417	2.67306
s_r	0.73884	0.92030	0.43992	2.07946	1.63495
RSD_r (%)	1.27	3.06	3.93	1.70	1.79
r	2.07	2.58	1.23	5.82	4.58
s_L^2	8.45221	13.27078	0.73013	24.62737	8.55508
s_R^2	8.99809	14.11773	0.92366	28.95154	11.22814
s_R	2.99968	3.75736	0.96107	5.38066	3.35084
RSD_R (%)	5.16	12.50	8.60	4.40	3.67
R	8.40	10.52	2.69	15.07	9.38

s_r^2	отклонение повторяемости
s_r	стандартное отклонение повторяемости
RSD_r (%)	относительное стандартное отклонение повторяемости
r	повторяемость
s_L^2	разница между лабораторными исследованиями
s_R^2	отклонение воспроизводимости
SR	отклонение воспроизводимости
RSD (%)	относительное стандартное отклонение воспроизводимости
R	воспроизводимость

OIV-MA-AS313-17 : R2004

Метод OIV-MA-AS313-18 **Метод IV типа**

Определение сорбиновой кислоты в винах

методом капиллярного электрофореза

(Резолюция Oeno 4/2006)

1 Область применения

Настоящий способ используется для определения сорбиновой кислоты в винах в диапазоне от 0 до 300 мг/л.

2 Сущность метода

Отрицательно заряженный сорбат-ион естественным образом обеспечивает легкое разделение с помощью капиллярного электрофореза. На выходе из капилляра детектирование осуществляется в ультрафиолетовом спектре при 254 Нм.

3 Реагенты и продукты

3.1 Реагенты

3.1.1 Дигидрогенофосфат натрия [10049-21-5] чистота > 96%

3.1.2 Гидрогенофосфат натрия [10028-24-7] чистота > 99%

3.1.3 Гидроксид натрия [1310-73-2] чистота > 97%

3.1.4 Гиппуровый натрий [532-94-5] чистота > 99%

3.1.5 Деминерализованная вода (< 15 MOHMS) или бидистиллированная вода

3.2 Миграционный буферный раствор

Буфер миграции составляется следующим образом:

Дигидрофосфат натрия (3.1.1): 5 мМ

Гидрогенофосфат натрия(3.1.2) 5 мМ

3.3 Внутренний стандарт

Гиппуровый натрий (3.1.4) в водном растворе 0,5 г/л$^{-1}$

3.4 Раствор для промывки

3.4.1 Гидроксид натрия (3.1.3) N/10

3.4.2 Гидроксид натрия (3.1.3) N

4 Подготовка образцов

Образцы вина готовятся следующим образом, который включает разбавление 1/20:

Вино для анализа:	0,5 мл
Гидроксид натрия (3.1.3):	0,5 мл
Внутренний стандарт (3.1.4) с 0,5 g. L^{-1}	0.5 мл

Qsp 10 мл с деминерализованной водой (3.1.5)

5 Условия эксплуатации

5.1 Кондиционирование капилляра

Перед его первым использованием и как только время миграции увеличится, капилляр необходимо кондиционировать в соответствии со следующим процессом:

5.1.1 Промыть раствором гидроксида натрия 1N (3.4.2) при давлении 20 фунтов на квадратный дюйм (140 КПа) в течение 8 минут.
5.1.2 Промыть раствором гидроксида натрия (3.4.1) 0,1 Н при давлении 20 фунтов на квадратный дюйм (140 КПа) для 12 минут.
5.1.3 Промыть водой (3.1.5) при давлении 20 фунтов на квадратный дюйм (140 КПа) в течение 10 минут.
5.1.4 Промыть миграционным буфером (3.2) при давлении 20 фунтов на квадратный дюйм (140 КПа) в течение 30 минут.

5.2 Условия миграции

Эти условия могут быть незначительно изменены в зависимости от используемого оборудования.

5.2.1 Капилляр из расплавленного кремнезема имеет длину 31 см и диаметр 50 мкм.
5.2.2 Температура миграции: 25°C
5.2.3 Длина волны считывания: 254 нм.
5.2.4 Считывание сигнала в прямом режиме (сорбиновая кислота поглощает в ультрафиолетовом
спектре).
5.2.5 Первая предварительная промывка под давлением 30 фунтов на квадратный дюйм (210 КПа) раствором гидроксида натрия 0,1 Н (3.4.1) в течение 30 секунд
5.2.6 Вторая предварительная промывка под давлением 30 фунтов на квадратный дюйм (210 КПа) с помощью миграционного буфера (3.2) в течение 30 секунд.
5.2.7 Впрыск производится под давлением 0,3 фунт/кв. дюйм (2,1 КПа) в течение 10 секунд.
5.2.8 Миграция длится примерно 1,5–2 минуты при разности потенциалов +25 кВ, при нормальной полярности (катод на выходе).
5.2.9 Некоторые устройства для капиллярного электрофореза предлагают флаконы большой емкости для миграционные буферные решения. Это предпочтительнее, когда последовательно проводится несколько анализов, поскольку электролитические свойства сохраняются дольше.

5.3 Чтение результатов

Пики поглощения для внутреннего стандарта и сорбиновой кислоты достигаются в среднем через 1-1,5 минуты после начала фазы миграции в реальном времени. Время миграции приблизительно постоянное, но может незначительно варьироваться в зависимости от состояния капилляра. Если время миграции уменьшается, необходимо восстановить капилляр, и, если номинальные условия не восстанавливаются, капилляр необходимо заменить.

6 Характеристики метода

Различные описанные этапы проверки были выполнены в соответствии с резолюцией OIV OENO 10/2005.

6.1 Внутрилабораторная повторяемость

Стандартное отклонение повторяемости Sr	1.6 мг/л $^{-1}$
Повторяемость r	4.6 мг/л $^{-1}$

6.2 Линейность

Линия регрессии	Y = 0,99491 X + 2,52727
Коэффициент корреляции r	0,9997
Остаточное стандартное отклонение Sxy	1,6 мг/л$^{-1}$
Стандартное отклонение наклона Sb	0,008 мг/л $^{-1}$

6.3 Внутрилабораторная воспроизводимость

Предел обнаружения Ld	1.8 мг/л $^{-1}$
Предел количественной оценки Lq	4.8 мг/л $^{-1}$

6.5 Надежность

6.5.1 Определение

Поскольку метод является относительным, незначительные изменения условий анализа не окажут влияния на конечный результат, но повлияют на время миграции.

6.6 Специфичность метода

Проверялось возможное влияние основных энологических добавок. Ни одна из них не повлияла на изменение полученных результатов.

6.7 Корреляция метода с эталонным методом OIV

Эталонным методом OIV является определение с помощью ультрафиолетовой абсорбционной спектрометрии.

Сорбиновую кислоту, извлекаемую перегонкой с водяным паром, определяют в винном дистилляте посредством ультрафиолетовой абсорбционной спектрометрии при 256 нм.

6.7.1 Сравнение повторяемости

	капиллярный электрофорез	Соответствующий метод OIV
Стандартное отклонение повторяемости S_r	1.6 мг/л	2.5 мг/л $^{-1}$
Повторяемость r	4.6 мг/л	7.0 мг/л $^{-1}$

6.7.2 Точность обычного метода по сравнению с эталонным методом

Коэффициент корреляции r	0.999
Среднее смещение Md	0.03 мг/л $^{-1}$
Среднее стандартное отклонение смещения Sd	3.1 мг/л $^{-1}$
Z-значение (Md/Sd)	0.01

ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ И СУЛЬФАТЫ. МЕТОД КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Метод OIV-MA-AS313-19 Метод II типа для органических кислот

III для сульфатов

Определение основных органических кислот вин и сульфаты методом капиллярного электрофореза (Oeno 5/2006, дополнено Oeno 407-2011)

1. Введение

Винная, яблочная и молочная кислоты и сульфаты разделяются и анализируются посредством капиллярного электрофореза после простого разбавления и добавления внутреннего стандарта.

2. Название

Определение основных органических кислот вин и сульфатов посредством капиллярного электрофореза.

3. Область применения

Капиллярный электрофорез может быть использован для определения винной и яблочной кислот в сусле, а также винной, яблочной и молочной кислот и сульфатов в винах, которые были предварительно разбавлены, дегазированы и отфильтрованы, если это необходимо.

4. Определения

4.1 Капиллярный электрофорез

Капиллярный электрофорез: все методы, при которых используют капиллярную трубку оченьмалого диаметра с соответствующим буферным раствором для эффективного разделения малых и больших электрически заряженных молекул в присутствии электрического тока высокого напряжения.

4.2 Буфер для электрофореза

Раствор, содержащий один или несколько растворителей и водных растворов с подходящей электрофоретической подвижностью для буферизации pH раствора.

4.3 Электрофоретическая подвижность

Способность иона быстро перемещаться под действием электрического поля.

Электроосмотический поток

Поток растворителя в буферном растворе вдоль внутренней стенки капиллярной трубки за счет смещения сольватированных ионов под действием поля и электрических зарядов кремнезема.

5. Сущность метода

Разделения водных растворов смеси методом капиллярного электрофореза получают путем дифференциальной миграции в забуференном электролите, что называется буфером. Электрофорез проводится в кремнеземной трубке с внутренним диаметром от 25 до 75 мкм. Водные растворы, подлежащие разделению, одновременно приводятся в действие 2 силами, как в заданном направлении, так и в противоположном ему. Эти две силы обусловлены **электрическим полем** и **электроосмотическим потоком.**

Электрическое поле представлено напряжением в вольтах, расположено между электродами, находящимися в пределах одного сантиметра от капиллярной трубки, и выражается в об/см$^{-1}$

Подвижность - это характеристика ионов. Чем меньше молекулы, тем больше их электрофоретическая подвижность.

Если внутренняя стенка капиллярной трубки не покрыта, отрицательные электрические заряды кремнезема фиксируют часть катионов буфера. Высвобождение и смещение в сторону катода части катионов буфера создают электроосмотический поток. Буферные растворы pH и добавки могут быть выбраны для контроля направления и интенсивности электроосмотического потока.

Добавление хромофорного иона в буферный раствор может быть использовано для получения отрицательных пиков, которые количественно представляют подлежащие разделению растворы, которые не поглощают при используемой длине волны.

6. Реагенты и продукты

6.1 Химически чистые продукты для анализа не менее 99%
6.1.1 Сульфат натрия или сульфат калия
6.1.2 L - винная кислота
6.1.3 D, L - яблочная кислота
6.1.4 Моногидрат лимонной кислоты
6.1.5 Янтарная кислота
6.1.6 D,L Молочная кислота
6.1.7 Дигидрофосфат натрия
6.1.8 Глюконат натрия
6.1.9 Хлорат натрия
6.1.10 Дипиколиновая кислота
6.1.11 Бромид цетилтриметиламмония
6.1.12 Ацетонитрил для ВЭЖХ
6.1.13 Деионизированная ультрафильтрованная чистая вода
6.1.14 Гидроксид натрия
6.2 Растворы

6.2.1 Калибровочный исходный раствор

- Раствор в чистой воде (6.1.13) различных кислот и сульфатов измеряют (6.1.1-6.1.6) при точно известных концентрациях в диапазоне от 800 до 1200 мг/л$^{-1}$
- Раствор следует хранить при температуре +5°C не более 1 месяца.

6.2.2 Внутренний стандартизированный раствор

- Раствор хлората натрия (6.1.9) примерно в 2 г/л$^{-1}$ в чистой воде (6.1.13)
- Раствор следует хранить при температуре +5°C не более 1 месяца.

6.2.3 Вводимый калибровочный раствор

В градуированную колбу объемом 50 мл класса "A", используя пипетки класса "A", осаждают:

- 2 мл калибровочного раствора (6.2.1)
- 1 мл внутреннего стандартного раствора (6.2.2)
- Доводят раствор до 50 мл чистой водой (6.1.13)

Гомогенизируют перемешиванием.

Раствор следует готовить ежедневно.

6.2.4 Растворы гидроксида натрия

6.2.4.1 Раствор гидроксида натрия M

В колбу объемом 100 мл помещают 4 г гидроксида натрия (6.1.14)

Доводят с помощью чистой воды (6.1.13)

Встряхивают до полного растворения.

6.2.4.2 раствор гидроксида натрия 0,1M

В колбу объемом 100 мл помещают 10 мл гидроксида натрия M (6.2.4.1)

Доводят с помощью чистой воды (6.1.13)

Гомогенизируют.

6.2.5 Электрофоретический буферный раствор

В градуированную колбу объемом 200 мл класса "A" помещают :

- 0,668 г дипиколиновой кислоты (6.1.10)
- 0,364 г бромистого цетилтриметиламмония. (6.1.11)
- 20 мл ацетонитрила (6.1.12)
- Приблизительно 160 мл чистой воды (6.1.13)
- Встряхивать до полного растворения (при необходимости поместить в ультразвуковую ванну для удаления любого соединившегося материала)
- Доводят M-раствор гидроксида натрия M (6.2.4.1) до pH 5.64, а затем 0,1 M раствора гидроксида натрия (6.2.4.2)
- Добавляют до 200 мл чистой воды (6.1.13)

- Гомогенизировать перемешиванием
- Раствор следует готовить ежемесячно.
- Хранить при стандартной лабораторной температуре.

Этот буферный раствор может быть заменен эквивалентным коммерческим продуктом.

7. ОБОРУДОВАНИЕ

Устройство для капиллярного электрофореза, необходимое для этих определений, состоит из следующего:

Устройство для смены образцов;

- Две бутылки (флаконы), содержащие буфер;
- Капиллярная трубка из кремнезема без покрытия, внутренний диаметр 50 мкм, длина 60 см, между входом в капиллярную трубку и детекторной ячейкой. В зависимости от устройства требуется дополнительно от 7 до 15 см, чтобы выходное отверстие капиллярной трубки было погружено в центр другой бутылки;
- Высоковольтный источник питания постоянного тока, способный выдавать напряжение от -30 до +30 кВ. Электроды, погруженные в две бутылки, из которых выходят выходы капиллярной трубки, соединены с клеммами генератора;
- Система повышения давления, способная обеспечивать циркуляцию буфера в капиллярной трубке и обеспечивать впрыск испытуемого образца;
- Детектор ультрафиолетового излучения;
- Система сбора данных.

8. Подготовка образцов

8.1 Дегазация и фильтрация

Образцы, богатые углекислым газом, дегазируют ультразвуком в течение 2 минут.

Мутные образцы фильтруются на мембране со средним диаметром пор 0,45 мкм.

8.2 Разбавление и добавление внутреннего стандарта

Помещают 2 мл образца в градуированную колбу объемом 50 мл. Добавляют 1 мл внутреннего стандартного раствора (6.2.2). Доводят до 50 мл чистой водой (6.1.13). Гомогенизируют.

9. Проведение исследования

9.1 Кондиционирование новой капиллярной трубки (например)

- Чистая вода (6.1.13) циркулирует в противоположном направлении (от выходного отверстия капиллярной трубки к входной колбе) в течение 5 минут при давлении приблизительно 40 фунтов на квадратный дюйм (2,76 бар или 276 кПа);
- 0,1 м гидроксида натрия циркулирует (6.2.4.2) в противоположном направлении в течение 5 мин при том же давлении;
- Чистая вода (6.1.13) циркулирует в противоположном направлении (от выходного отверстия капиллярной трубки к входной колбе) в течение 5 минут при том же давлении;
- Цикл циркуляции чистой воды, 0,1 М натрия гидроксид, чистая вода повторяется;
- Раствор электрофоретического буфера (6.2.5) циркулируется в противоположном направлении в течение 10 минут.

9.2. Восстановление капиллярной трубки в процессе использования (необязательно)

Когда качество разделения становится недостаточным, необходима новая подготовка капиллярной трубки. Если полученные результаты все еще неудовлетворительны, заменяют капиллярную трубку и регулируют ее.

9.3. Проверка качества капиллярной трубки (опция)

4 раза проводят анализ калибровочного раствора в соответствии с рекомендованными условиями анализа.

9.4. Условия разделения и обнаружения (например)

- Зажигают лампу детектора за 1 час до начала анализов;
- Промывают капиллярную трубку путем циркуляции буфера в течение 3 минут в противоположном направлении при давлении 40 фунтов на квадратный дюйм;
- Давление вводят образцы (подготовленные при 8,1) под давлением 0,5 фунт/кв. дюйм в течение 6-15 секунд;
- Полярность регулируется таким образом, чтобы анод находился со стороны детектора;
- Подавают напряжение от 0 до 16 кВ в течение 1 мин, затем 16 кВ в течение примерно 18 мин (продолжительность разделения может незначительно варьироваться в зависимости от качества капиллярной трубки);
- Поддерживают температуру на уровне + 25°C;
- Обнаружение в ультрафиолетовом диапазоне составляет 254 Нм.

- Промывают капиллярную трубку путем циркуляции электрофоретического буфера (6.2.5) в течение 2 минут в противоположном направлении при давлении 40 фунтов на квадратный дюйм

- Меняют электрофоретический буфер (6.2.5), содержащийся во впускной и выпускной колбах, по крайней мере, через каждые 6 впрыскиваний.

9.5 Порядок проведения анализов (пример)

Меняют электрофоретический буфер (6.2.5) для каждой новой серии анализов.

- Последовательность анализа по порядку содержит: анализ эталонного материала (образец внешней концентрации, известный для различных кислот, подлежащих измерению в зависимости от используемой кислоты);

- Анализ образцов, подготовленных в 8.2, хроматограммы должны выглядеть так, как показано в приложении A;

- В конце анализа промывают чистой водой (6.1.13) на 10 мм в противоположном направлении (выход капиллярной трубки к входу);

- Выключают лампу детектора.

10. Подсчет результатов

Расчеты основаны на измерении площадей поверхности пиков, полученных после интегрирования.

Площади поверхности пиков водных растворов калибровочного раствора (6.2.3) корректируются с учетом изменений площадей поверхности пиков внутреннего стандарта. Рассчитывается коэффициент отклика для каждой кислоты.

Площади поверхности пиков внутреннего стандарта и пиков водных растворов считываются для каждого образца. Площади поверхности водных растворов, подлежащих анализу, пересчитываются с учетом изменений площадей поверхности пиков внутреннего стандарта во второй раз, чтобы получить "скорректированные" площади поверхности.

Скорректированные площади поверхности затем умножаются на значение соответствующего коэффициента отклика.

Можно использовать автоматическую систему управления данными, чтобы они могли контролироваться в соответствии с принципами, описанными выше, а также с использованием передовых методов (расчет коэффициента отклика и/или создание калибровочной кривой).

ФОРМУЛА РАСЧЕТА

Сокращения, используемые для расчета концентрации в кислоте, приведены в следующей таблице:
Поверхности выражаются целыми числами единиц интегрирования.
Концентрация указана в г/л (указывается с точностью до двух знаков после запятой).

АББРЕВИАТУРЫ		
	раствор стандартного образца	ОБРАЗЕЦ
ПЛОЩАДИ ПОВЕРХНОСТИ ТИТРУЕМЫХ ПИКОВ	S_{AR}	S_{AE}
ВНТРЕННИЕ СТАНДАРТНЫЕ ПИКИ	S_{EIR}	S_{EIE}
КОНЦЕНТРАЦИЯ	C_{AR}	C_E

Формула расчета:

$$C_E = \frac{\mathbf{CAR \times SAE \times SEIR}}{\mathbf{SAR \times EIE}}$$

Каждый раз, когда это возможно, используется дублирующий анализ, чтобы выявить возможную ошибку в распознавании пиков или неточность интегрирования. Устройство для смены образцов позволяет проводить анализы в автоматическом режиме на протяжении всех суток.

11. Прецизионность

11.1 Организация испытаний

Межлабораторные испытания и соответствующие результаты описаны в приложениях B1 и B2.

11.2 Измерение прецизионности

ОЦЕНКА ТОЧНОСТИ ПУТЕМ МЕЖЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ

Количество задействованных лабораторий: 5

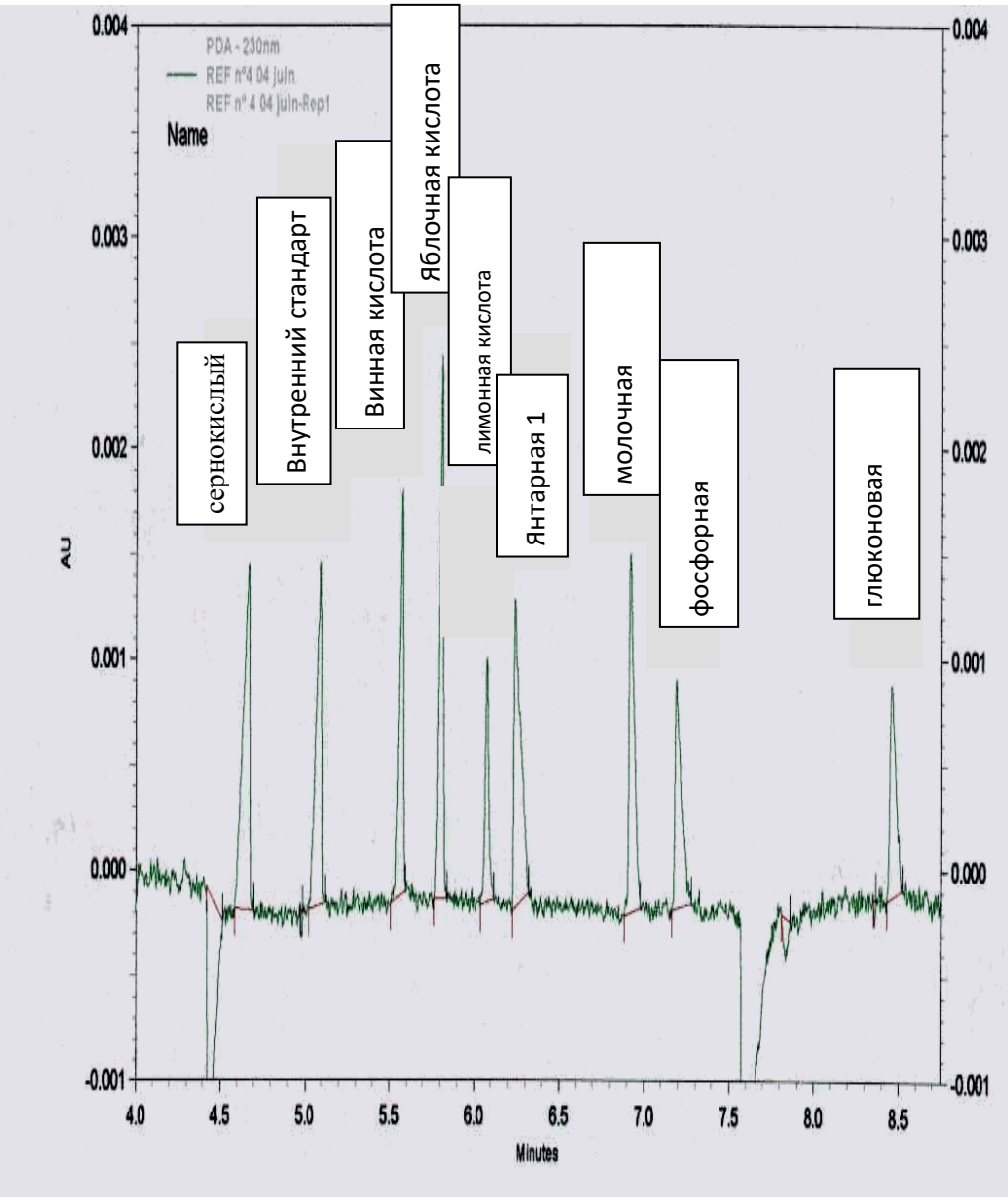
Результаты, выраженные в мг/л

	ВИННАЯ КИСЛОТА	ЯБЛОЧНАЯ КИСЛОТА	МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА
Средние значения концентраций	1395	1884	1013
Средние значения стандартных отклонений при повторности	38	54	42
Средние значения стандартных отклонений воспроизводимости	87	113	42

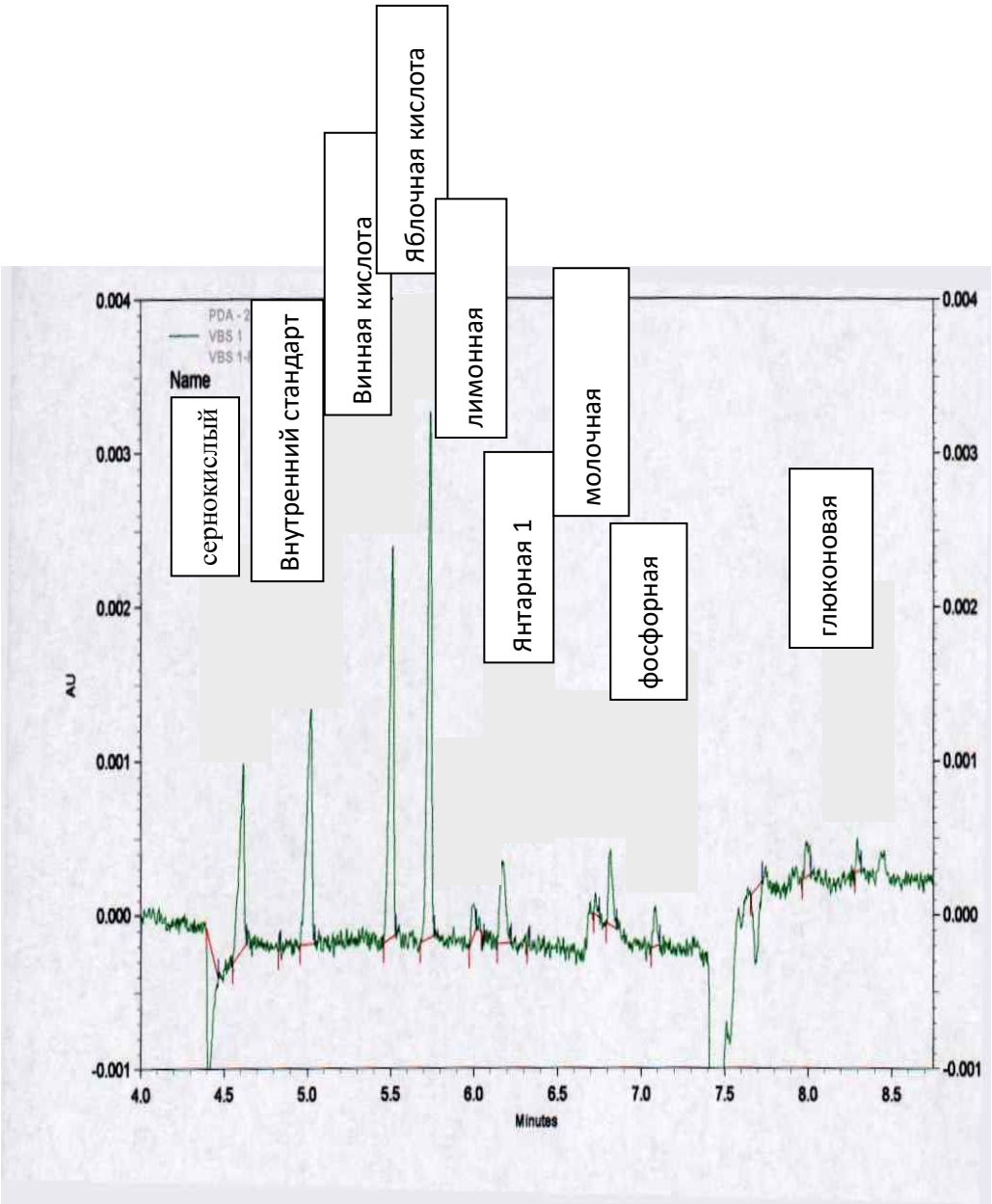
12. ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ A

ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА КИСЛОТЫ



ЭЛЕКТРОФЕРОГРАММА ВИНА



ПРИЛОЖЕНИЕ B1
Статистические данные, полученные по результатам межлабораторных испытаний (2006)

Согласно ISO 5725-2: 1994, в ходе межлабораторного испытания были определены следующие параметры. Это испытание было проведено лабораторией «Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes de Bordeaux», (Франция).

Год межлабораторных испытаний: 2006
Количество лабораторий: 5
Количество образцов: 8 двойных слепых (2 сухих белых вина, 2 сладких белых вина, 2 розовых вина и 2 красных вина)

МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Определение ВИННОЙ КИСЛОТЫ методом капиллярного электрофореза

Идентификация образца	Сухие белые вина		Ликерные белые вина		Розовые вина		Красные вина	
	A + D	B + C	E + F	G + H	I + J	K + L	M + N	O + P
Количество лабораторий, принимающих участие	5	5	5	5	5	5	5	5
								4
Количество принятых результатов	5	5	4	5	5	5	4	5
Среднее значение в мг/л	1943	2563	1440	255	553	1885	1373	1148
Допустимое значение в мг/л	1943	2563	1387	2217	1877	1593	1370	1830
Стандартное отклонение повторяемости (Sr)	27	25	106	23	40	31	25	24
Коэффициент повторяемости вариации	1,4	1,0	7,7	1,0	2,2	1,9	1,8	1,3
Предел повторяемости (r)	77	70	298	65	113	86	70	66
Стандартное отклонение воспроизводимости (SR)	96	128	174	80	57	55	52	53
Коэффициент воспроизводимости вариации в %	4,9	5	12,6	3,6	3	3,5	3,8	2,9
Предел воспроизводимости (R)	268	359	488	223	160	154	145	148

МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Определение ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ методом капиллярного электрофореза

Идентификация образца	Сухие белые вина		Ликерные белые вина		Розовые вина		Красные вина	
	A + D	B + C	E + F	G + H	I + J	K + L	M + N	O + P
Количество лабораторий, принимающих участие	5	5	5	5	5	5	5	5
								4
Количество принятых результатов	5	5	4	5	5	5	4	5
Среднее значение в мг/л	2571	1602	1680	2539	3524	2109	173	869
Допустимое значение в мг/л	2571	1602	1680	2539	3524	2109	177	869
Стандартное отклонение повторяемости (Sr)	54	19	113	35	61	109	7	32
Коэффициент повторяемости вариации	2,1	1,2	6,7	1,4	1,7	5,2	4,1	3,7
Предел повторяемости (r)	151	54	315	99	170	305	20	89
Стандартное отклонение воспроизводимости (SR)	90	51	171	97	279	142	21	53
Коэффициент воспроизводимости вариации в %	13,6	9,8	41	39,6	14,7	9	14,1	7,6
Предел воспроизводимости (R)	252	142	479	273	782	397	59	148

МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Определение МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ методом капиллярного электрофореза

Идентификация образца	Сухие белые вина		Ликерные белые вина		Розовые вина		Красные вина	
	A + D	B + C	E + F	G + H	I + J	K + L	M + N	O + P
Количество лабораторий, принимающих участие	5	5	5	5	5	5	5	5
								4
Количество принятых результатов	4	5	5	5	5	5	4	5
Среднее значение в мг/л	659	1324	258	255	553	1885	2066	1148
Допустимое значение в мг/л	650	1324	258	255	553	1885	2036	1148
Стандартное отклонение повторяемости (Sr)	20	42	20	39	27	99	75	16
Коэффициент повторяемости вариации	3,1	3,2	7,8	15,1	4,8	5,3	3,7	16,0
Предел повторяемости (r)	57	117	56	108	75	278	211	46
Стандартное отклонение воспроизводимости (SR)	20	42	20	39	27	99	75	16
Коэффициент воспроизводимости вариации в %	13,6	9,8	41	39,6	14,7	9	14,1	7,6
Предел воспроизводимости (R)	247	363	296	283	227	475	802	243

ПРИЛОЖЕНИЕ B2
Статистические данные, полученные по результатам межлабораторных испытаний (сульфаты 2010)

В соответствии со стандартом ISO 5725-2:1994 в ходе межлабораторных испытаний были определены следующие параметры. Данное исследование было проведено лабораторией «Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto» (Португалия).

Год межлабораторных испытаний: 2010-2011
Количество лабораторий: 7 (одна лаборатория прислала два набора результатов, полученных с помощью двух разных приборов)
Количество образцов: 6 двойной анонимности.

Показатели	Белое вино A/G	Розовое вино (B/F)	Розовое вино (C/O)	Красное вино (D/M)	Десертное вина (E/N)	Десертное вина (I/K)	Белое вино (H/Q)	Красное вино (J/P)	Ликерные вина (L)
Количество групп	7	7	6	7	8	7	7	7	8
Количество повторений	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Минимум (г/л K_2SO_4)	0,71	0,34	0,40	0,62	1,79	1,06	1,38	1,96	2,17
Максимум (г/л K_2SO_4	0,88	0,54	0,52	0,75	2,40	1,35	1,70	2,30	2,85
Изменение повторяемости s_r^2	0,0012	0,0011	0,0001	0,0016	0,0063	0,0013	0,0036	0,0015	0,0053
Межгрупповая вариация S_L^2	0,00148	0,0023 0	0,0016 3	0,00055	0,01952	0,01082	0,00668	0,01744	0,03552
Изменение воспроизводимости s_R^2	0,0027	0,0034	0,0018	0,0022	0,0258	0,0122	0,0103	0,0189	0,0408
Значение (г/л K_2SO_4)	0,78	0,43	0,44	0,69	2,01	1,19	1,49	2,15	2,41
Стандартное отклонение	0,04	0,03	0,01	0,04	0,08	0,04	0,06	0,04	0,07
Повторяемость (г/л K2SO4)	0,100	0,093	0,031	0,115	0,224	0,103	0,170	0,109	0,206
Предел r (г/л K_2SO_4)									
Повторяемость CV	5%	8%	3%	6%	4%	3%	4%	2%	3%
Стандартное отклонение	0,05	0,06	0,04	0,05	0,16	0,11	0,10	0,14	0,20
Воспроизводимость (г/л K_2SO_4)									
Предел R (г/л K_2SO_4)	0,148	0,165	0,118	0,132	0,454	0,312	0,287	0,389	0,572
Воспроизводимость	7%	14%	10%	7%	8%	9%	7%	6%	8%
коэффициент Горвица	1,1	2,1	1,5	1,1	1,6	1,7	1,3	1,3	1,7

13. БИБЛИОГРАФИЯ

ARELLANO M., COUDERC F. and PUIG .L (1997): Simultaneous separation of organic and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. Application to wines and fruit juices. Am. J. Enol. Vitic., 48, 408-412.

KANDL T. and KUPINA S. (1999): An improved capillary electrophoresis procedure for the determination of organics acids in grape juices and wine. Am. J. Enol. Vitic., 50, 155-161.

KLAMPF C.F. (1999): Analysis of organic acids and inorganic anions in different types of beer using capillary zone electrophoresis. J. Agric. Food Chem., 47, 987- 990

МЕТОД OIV-MA-AS313-20 **Метод IV типа**

Определение содержания сорбиновой, бензойной и салициловой кислот в вине с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии

(Резолюция Oeno 6/2006)

1. Введение

Сорбиновая кислота и ее калиевая соль представляют собой антисептик, который можно использовать в виноделии, хотя в некоторых страны запрещено даже присутствие этих веществ, основной причиной чего является запах герани, который появляется, когда сорбиновая кислота расщепляется молочнокислыми бактериями. Присутствие бензойной и салициловой кислот по-прежнему запрещено в вине, но допускается к использованию в других напитках.

2. Область применения

Все вина и виноградное сусло, особенно те, которые могут содержать только следы сорбиновой, бензойной или салициловой кислот (демонстрация от 1 мг/л).

3. Сущность метода

Антисептики определяют с помощью ВЭЖХ путем прямого введения образца в колонку, функционирующую с помощью изократической противофазной распределительной хроматографии с детекцией ультрафиолетового излучения на длине волны 235 нм.

4. Реактивы

4.1 Пресная вода с микрофильтрацией (например, удельное сопротивление более 18,2 МОм)
4.2 Тетрагидрофуран без примесей
4.3 Метанол без примесей
4.4 0,1 М соляной кислоты (приготовленной с помощью воронки для разбавления)
4.5 Вода с pH равным 2: регулируют pH 650 мл воды (4.1) до pH равному 2 с помощью прибора для измерения уровня pH (5.5) и добавляют 0,1 М соляной кислоты по капле без перемешивания (4.4)
4.6 Раствор для элюирования: смешивают 650 мл воды с уровнем pH равным 2 (4,5) с 280 мл метанола (4,3) и 7 мл тетрагидрофурана (4,2)

Примечание: аналогичным образом можно использовать другие растворители для элюирования, например: 80% ацетат аммония 0,005М (0,38 г/л), доведенный до уровня pH равного 4 чистой уксусной кислотой + 20% ацетонитрила.

4.7 Сорбиновая кислота без примесей
4.8 Бензойная кислота без примесей
4.9 Салициловая кислота без примесей
4.10 Абсолютный спирт
4.11 50% об водно-спиртовой раствор: наливают 500 мл абсолютного спирта (4,10) в литровую колбу и доводят до полного объема дистиллированной водой (4.1)
4.12 Исходный раствор сорбиновых кислот на 500 мг/л: растворяют 50 мг сорбиновой (4,7), бензойной (4,8) и салициловой (4,9) кислоты в 100 мл 50% водно-спиртовой раствора (4.11)

4.13 Суррогатные растворы сорбиновой, бензойной и салициловой кислот: разбавляют исходный раствор (4.12) в водно-спиртовом растворе (4.11) таким образом, чтобы получить требуемые конечные концентрации. Например, для раствора
- 200 мг/л: наливают 20 мл исходного раствора (4.12) в колбу объемом 50 мл и доводят до отметки заполнения 4.11.
- 1 мг/л: наливают 2 мл исходного раствора (4.12) в колбу объемом 50 мл и доводят до отметки заполнения 4.11.
Промежуточные растворы могут быть получены таким же образом, чтобы соответствовать требованиям калибровки.

5. Оборудование

5.1 Лабораторная посуда, особенно пипетки и мерные колбы
5.2 Ультразвуковая ванна
5.3 Устройство вакуумной фильтрации для больших объемов (1 литр) с использованием мембранных фильтров с диаметром пор менее 1 мкм (обычно 0,45 мкм)
5.4 Мини-фильтр для образцов (1-2 мл) с использованием мембранных фильтров с диаметром пор менее 1 мкм (обычно 0,45 мкм)
5.5 Прибор для измерения уровня pH
5.6 Жидкофазный хроматограф с изократическим режимом, оснащенный системой впрыска для небольших объемов (например), петлевым клапаном объемом 10 или 20 мкл.
5.7 Детектор, способный работать при ультрафиолетовом излучении 235 нм и оснащенный циркуляционным резервуаром для ВЭЖХ (например, 8 мкл на 1 см оптической толщины)

5.8 Колонка ВЭЖХ со стационарной фазой 5 мкм типа кремнезема с иммобилизацией октадециловыми группами (C18), длина 20 см, внутренний диаметр 4 мм
5.9 Система сбора данных

6. Подготовка образцов и растворитель для элюирования

6.1 Фильтруют образцы, подлежащие анализу, с помощью мини-фильтра (5.4)
6.2 Дегазируют растворитель для элюирования (4.6) в течение 5 минут с помощью ультразвуковой ванны (5.2)

6.3 Отфильтровывают растворитель при помощи устройства, описанного в (5.4)

7. Проведение исследования

7.1 Кондиционирование колонки. Перед впрыском запускают насос и промывают колонку растворителем в течение не менее 30 минут.

7.2 Вводят один из суррогатных растворов (4.13) для проверки чувствительности системы и обеспечения удовлетворительного разрешения пиков анализируемых веществ.

7.3 Вводят образец, подлежащий анализу. Можно протестировать идентичный образец, к которому были добавлены искомые кислоты (приводят в соответствие их количество с обозначенным во время предыдущего анализа - при наличии 1 мг добавляют 1 мг и так далее).

Проверяют разрешение пиков искомых кислот с помощью пиков вин (обычно в этой зоне их нет).

8. Расчет

Определив пики определяемых кислот в образце, сравнивают площадь пика с площадью пика кислот суррогатного раствора (4.13) с известной концентрацией C.

Например, пусть s - площадь пика определяемой кислоты, а S – площадь пика раствора (4.13) с концентрацией C:

9. Характеристики метода

	Сорбиновая кислота	Бензойная кислота	Салициловая кислота
Диапазон линейности	от 0 до 200 мг/л	от 0 до 200 мг/л	от 0 до 200 мг/л
Прецизионность (скорость восстановления)	> 90 %	> 90 %	> 90 %
Повторяемость: r*	2%	3%	8%
Воспроизводимость R*	8%	9%	12%
Предел детектирования	3 мг/л	3 мг/л	3 мг/л
Нижняя граница определяемых концентраций	5 мг/л	6 мг/л	7 мг/л
Неопределенность	11%	12%	13%

Библиография

- Dosage de l'acide sorbic dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch., Feuillets Verts O.I.V., 654-681.

- Dosage de l'acide salicylic dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch., Feuillets Verts O.l.V., 655-682.

- Dosage de l'acide benzoic, dans les sodas et autres produits alimentaires liquides, par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch. Ann. Fals. Exp. Chim. 71, 761, 35-39.

Метод OIV-MA-AS313-21 **Метод IV типа**

Определение наличия метавинной кислоты
(Резолюция Oeno 10/2007)

1. Введение

Чтобы избежать выпадения осадка винной кислоты, количество метавинной кислоты, добавляемое в вино, обычно пропорционально разнице между общим содержанием винной кислоты после горячего гидролиза метавинной кислоты и винной кислотой, до гидролиза. Однако, принимая во внимание точность определения винной кислоты, следы метавинной кислоты этим методом не обнаруживаются, и таким образом вещество, использование которого в некоторых странах ннедопустимо, следует охарактеризовать более специфическим методом.

2. Область применения

В большинстве вин возможно обнаружить следы метавинной кислоты.

3. Сущность метода

В относительно кислых средах метавинная кислота образует нерастворимый осадок с ацетатом кадмия; это единственный из всех элементов, присутствующих в сусле и вине, который дает такой осадок.

Примечание: Винная кислота также осаждается ацетатом кадмия, но только в том случае, если содержание спирта составляет более 25%. Осадок повторно растворяется в воде, в противоположность осадку, полученному с помощью метавинной кислоты.

Осадок кадмия метавинной кислоты разрушается при нагревании с гидроксидом натрия и выделяет винную кислоту. В результате раствор окрашивается в специфический оранжевый цвет, что указывает на присутствие солей метаванадиевой кислоты.

4. Реагенты

4.1 Раствор ацетата кадмия при 5 р.100
4.1.1 Дигидрат ацетата кадмия 98%
4.1.2 Уксусная кислота без примесей
4.1.3 Дистиллированная или деминерализованная вода

4.1.4 Раствор ацетата кадмия: растворить 5 г ацетата кадмия (4.1.1) в 99 мл воды (4.1.3), добавить 1 мл чистой уксусной кислоты (4.1.2)
4.2 Гидроксид натрия 1М
4.3 Серная кислота 1М
4.4 Раствор метаванадата аммония м/об 2%
4.4.1 Метаванадат аммония
4.4.2 Тригидрат ацетата натрия 99%
4.4.3 Раствор ацетата натрия при 27 р. 100: растворяют 478 г ацетата натрия (4.4.2) в 1 литре воды (4.1.3)
4.4.4 Раствор метаванадата аммония: растворяют 10 г метаванадата аммония (4.4.1) в 150 мл 1 М гидроксида натрия (4.2), добавляют 200 раствора ацетата натрия при 27 р. 100 (4.4.3) и доливают до 500 мл воды (4.1.3)
4.5 Этанол, объёмный процент 96%

5. Аппаратура

5.1 Центрифуга с ротором, способная вмещать бутылки объемом 50 мл
5.2 Спектрометр, способный работать в видимом спектре и содержащий кюветы с оптической толщиной 1 см.

6. Метод работы

6.1 Центрифугируют 50 мл вина в течение 10 минут при 11000 оборотах в минуту
6.2 40 мл прозрачного вина с помощью пробирки помещают в колбу для центрифуги
6.3 Добавляют 5 мл этанола, объёмный процент 96% (4.5)
6.4 Добавляют 5 мл раствора ацетата кадмия (4.1.4)
6.5 Перемешивают и оставляют на 10 минут
6.6 Центрифугируют в течение 10 минут при 11000 об/мин
6.7 Сцеживают, полностью перевернув колбу (один раз), и удаляют надосадочную жидкость.

В присутствии метавинной кислоты на дне пробирки образуется пластинчатый осадок.
При отсутствии какого-либо осадка образец будет рассматриваться как свободный от метавинной кислоты. В противном случае или если необходимо с уверенностью установить наличие легкого осадка, действуют следующим образом:

6.8 Промывают осадок один раз 10 мл воды (4.1.3) под сильным напором в направлении дна пробирки, чтобы отделить осадок от дна
6.9 Добавляют 2 мл раствора ацетата кадмия (4.1.4)
6.10 Центрифугируют при 11000 об/мин в течение 10 минут, затем удаляют надосадочную жидкость, полностью перевернув пробирку (один раз)
6.11 После добавления одного мл 1 м гидроксида натрия (4.2) погружают пробирку для центрифугирования на 5 минут на водяную баню при 100°C
6.12 После охлаждения добавляют 1 мл 1 м серной кислоты (4.3) и 1 мл раствора метаванадата аммония (4.4.4)
6.13 Оставляют на 15 минут
6.14 Центрифугируют в течение 10 минут при 11000 об/мин
6.15 Выливают надосадочную жидкость в резервуар спектрофотометра и измеряют поглощение при 530 нм, предварительно определив нулевую точку с помощью воды (4.1.3)

а именно: $\mathbf{Abs_E}$

Стандарт. Параллельно готовят стандартный раствор, содержащий то же вино, что и анализируемое, но предварительно нагревают его в течение 2,5 минут с использованием микроволнового генератора, установленного на максимальную мощность, или на водяной бане при 100° C в течение 5 минут.

а именно: $\mathbf{Abs_T}$

6. Расчет

Присутствие метатартаровой кислоты в вине устанавливается по формуле при 530 нм:

$$\mathbf{Abs_E - Abs_T > 0.050}$$

Метод OIV-MA-AS313-22 **Метод II типа**

Одновременное определение L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислота (эритробиновой кислота) в вине методом ВЭЖХ и УФ-детекции (Резолюция Oeno 11/2008)

1. Введение

Аскорбиновая кислота - это антиоксидант, который естественным образом содержится в широком спектре пищевых продуктов.
Естественное количество аскорбиновой кислоты в винограде уменьшается во время производства сусла и вина, но ее можно добавлять в сусло и в вина в определенных пределах.
Описанный метод был подтвержден в совместном исследовании путем анализа образцов вина с повышенными количествами от 30 мг/л до 150 мг/л для L-аскорбиновой кислоты и от 10 мг/л до 100 мг/л для D-изоаскорбиновой кислоты соответственно**.**

2. Область применения

Этот метод подходит для одновременного определения L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислота (эритробиновая кислота) в вине с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и УФ-детекции в диапазоне от 3 мг/л до 150 мг/л.
При содержании выше 150 мг/л необходимо разбавление раствора пробы.

3. Сущность метода

Образцы непосредственно вводятся в систему ВЭЖХ после мембранной фильтрации.
Анализируемые вещества разделяют на колонке с обращенной фазой и проводят УФ-детекцию при 266 нм. Количественное определение L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислоты проводится со ссылкой на внешний стандарт.

Примечание: Столбцы и условия эксплуатации приведены в качестве примера. Другие типы столбцов также могут обеспечить хорошее разделение.

4. Реагенты и материалы

4.1 Реагенты

4.1.1. N-октиламин, чистота ≥ 99,0 %
4.1.2. Ацетат натрия, 3 H_2O, чистота ≥ 99,0 %
4.1.3. Чистая уксусная кислота, 100 %
4.1.4. Фосфорная кислота, примерно 25%

4.1.5. щавелевая кислота, чистота ≥ 99.0 %
4.1.6. аскорбатоксидаза
4.1.7. L- аскорбиновая кислота, ультра ≥ 99.5 %
4.1.8. D-изо-аскорбиновая кислота, чистота ≥99.0 %
4.1.9. Двухдистиллированная вода
4.1.10. Метанол, чистый для анализа 99,8 %

4.2 Подготовка к мобильной фазе

4.2.1 Растворы для мобильной фазы
Для мобильной фазы подготовить следующие растворы:
4.2.1.1 12,93 г n-октиламина в 100 мл метанола
4.2.1.2 68,05 г ацетата натрия, 3 H_2O в 500 мл двухдистиллированной воды
4.2.1.3 12,01 г чистой уксусной кислоты в 200 мл двухдистиллированной воды
4.2.1.4 Буферный раствор (pH 5,4): 430 мл раствора ацетата натрия (4.2.1.2) и 70 мл раствора уксусной кислоты (4.2.1.3)

4.2.2 Подготовка мобильной фазы

Добавляют 5 мл раствора n-октиламина (4.2.1.1) примерно к 400 мл двухдистиллированной воды в стакане. Доводят этот раствор до pH от 5,4 до 5,6, добавляя 25% -ную фосфорную кислоту (4.1.4) по капле. Добавляют 50 мл буферного раствора (4.2.1.4), переносят композитную смесь в мерную колбу объемом 1000 мл и заливают дистиллированной водой. Перед использованием подвижная фаза должна быть отфильтрована через мембрану (регенерированная целлюлоза, 0,2 мкм) и, по возможности, дегазирована гелием (примерно 10 минут) в зависимости от потребностей используемой системы ВЭЖХ.

4.3 Приготовление стандартного раствора

Примечание: Все стандартные решения (стандартный раствор 4.3.1. и рабочие растворы 4.3.2)
Следует готовить ежедневно и предпочтительно хранить в холодном виде в холодильнике до введения.

4.3.1 Приготовление исходного раствора (1 мг/мл)

Готовят 2%-ный водный раствор щавелевой кислоты и удаляют растворенный кислород путем
продувки азотом.
Взвешивают ровно по 100 мг L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислоты в мерной колбе объемом 100 мл и доводят до метки 2%-ным водным раствором щавелевой кислоты.

4.3.2 Подготовка рабочих растворов

Для рабочих растворов разбавляют исходный раствор (4.3.1) до требуемой концентрации 2%-ным раствором щавелевой кислоты. Рекомендуются концентрации от 10 мг/л до 120 мг/л, например, 100 мкл, 200 мкл, 400 мкл, 800 мкл, 1200 мкл до 10 мл, соответствующие 10, 20, 40, 80 и 120мг/л.

5. Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование, в частности следующее:
5.1 ВЭЖХ-насос
5.2 Контурный инжектор, 20 мкл
5.3 УФ-детектор

6. Отбор проб

Образцы вина перед введением пропускают через мембрану с размером пор 0,2 мкм.
При концентраций выше 150 мг/л следуем разбавить пробу**.**

7. Прведение исследования

7.1 Условия эксплуатации ВЭЖХ

Вводят 20 мкл образца, отфильтрованного мембраной, в хроматографический аппарат.
Предварительная колонка: например, Нуклеозил 120 C18 (4 см x 4 мм x 7 мкм)
Колонка: например, Нуклеозил 120 C18 (25 см x 4 мм x 7 мкм)
Объем инъекции: 20 мкм
Подвижная фаза: см. 4.2.2, изократическая
Скорость потока: 1 мл/мин
УФ-детектирование: 266 нм
Полоскание: не менее 30 мл двудистиллированной воды с последующим добавлением 30 мл метанола и 30 мл ацетонитрила.

7.2 Идентификация/Подтверждение

Идентификация пиков производится путем сравнения времени удерживания между стандартами и образцами. С помощью хроматографической системы, описанной в качестве примера, время удерживания составляет: для L-аскорбиновой кислоты 7,7 мин. и для D-изо-аскорбиновой кислоты 8,3 мин. соответственно. (См. рис. 1, хроматограмма A).

Для дальнейшего подтверждения положительных результатов эти образцы следует обработать шпателем с аскорбатоксидазой и снова измерить (см. рисунок 1, хроматограмма B).
В результате деградации L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислоты, вызванной аскорбатоксидазой, не должно быть обнаружено сигнала во время удерживания L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислоты. Если обнаружены мешающие пики, площадь пика следует учитывать при расчете концентрации анализируемых веществ.

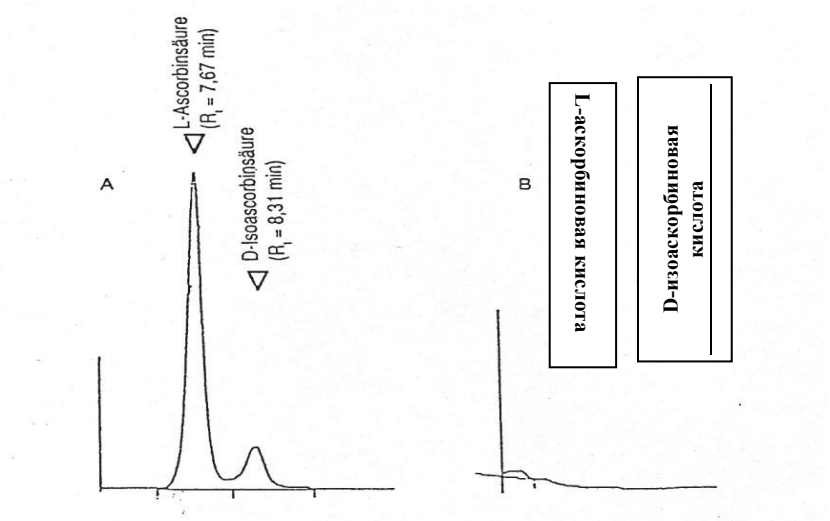


Рисунок 1: Пример хроматограммы белого вина:
А: до обработки аскорбатоксидазой; Б: после обработки

Примечание: Рекомендуется анализировать образцы, обработанные аскорбатоксидазой в конце каждого цикла, после чего следует этап промывки для удаления оставшейся аскорбатоксидазы из колонки. В противном случае L-аскорбиновая кислота и D-изо-аскорбиновая кислота могут быть преобразованы оставшейся аскорбатоксидазой во время ВЭЖХ, и результат может измениться.

8. Порядок расчетов

Готовят калибровочную кривую из рабочих растворов (4.3.2). В соответствии с методом внешнего стандарта количественное определение L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой
кислоты выполняется путем измерения площадей пиков и сравнения их с соответствующей концентрацией на калибровочной кривой.

Выражение результатов

Результаты выражены в мг/л L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислоты соответственно с одним десятичным знаком (например, 51,3 мг/л).
Для объемов превышающих 150 мг/л следует учитывать разбавление.

9. Прецизионность

Метод был протестирован в совместном исследовании с участием 27 лабораторий, организованном бывшим Bundesgesundheitsamt (Германия) в 1994 году.
Методы совместных испытаний соответствовали §35 немецкого закона о продуктах питания, который был принят O.I.V. до тех пор, до введения нового протокола (OE № 6/2000).

Исследование включало четыре различных образца вина - два белых вина и два красных вина, по пять проб каждого типа. В связи с тем, что не было возможности подготовить образцы с достаточной стабильностью анализируемых веществ (ввиду различной скорости распада), было решено отправить участникам определенное количество чистых стандартных веществ вместе с образцами вина.
Лабораториям было рекомендовано перевести стандарты количественно в образцы вина и немедленно проанализировать их. Были проанализированы объемы от 30 до 150 мг/л для L-аскорбиновой кислоты и от 10 до 100 мг/л для D-изо-аскорбиновой кислоты. В приложении представлены подробные результаты исследования. Оценка проводилась в соответствии с DIN/ISO 5725 (версия 1988) стандарт.
Стандартные отклонения повторяемости (s_r) и воспроизводимости (S_R) соответствовали концентрациям L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислоты.
Фактические параметры точности могут быть рассчитаны с помощью следующих уравнений:

L-аскорбиновая кислота

$$s_r = 0.011\ x + 0.31$$
$$s_R = 0.064\ x + 1.39$$

где x: L-концентрация аскорбиновой кислоты (мг/л)

D-изоаскорбиновая кислота

$$s_r = 0{,}014\ x + 0{,}31$$
$$S_R = 0{,}079\ x + 1{,}29$$

где x: D-концентрация изо-аскорбиновой кислоты (мг/л)

Пример:
D-изо-аскорбиновая кислота 50 мг/л s_r = 1,0 мг/л
S_R = 5,2 мг/л

10. Другие характеристики анализа

10.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения этого метода был оценен в 3 мг/л для L-аскорбиновой кислоты и D-изоаскорбиновой кислоты

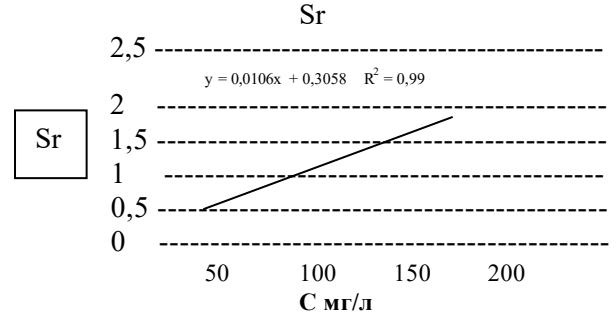
10.2. Достоверность

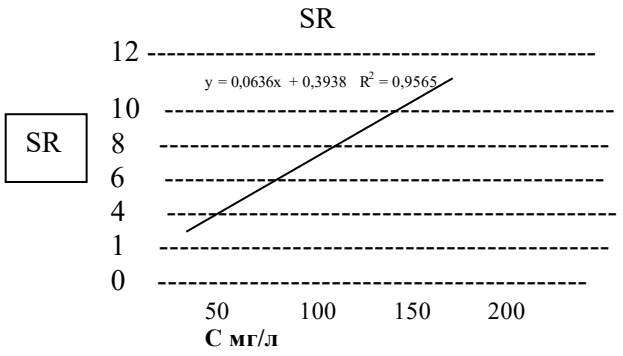
Среднее восстановление, рассчитанное по результатам совместного исследования по четырем образцам (см. Приложение) составло:
100,6 % для L-аскорбиновой кислоты
103,3 % для D-изо-аскорбиновой кислоты.

11. ПРИЛОЖЕНИЕ: Совместное испытание

L-аскорбиновая кислота

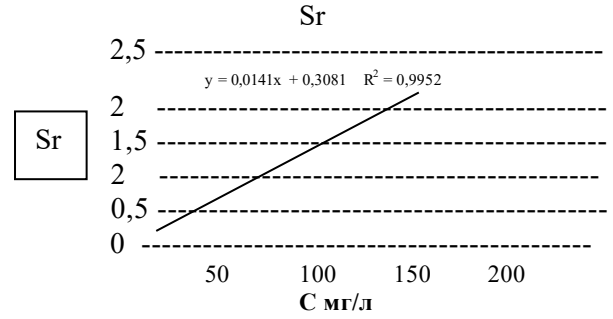
	Красное вино I	Белое вино II	Красное вино III	Белое вино IV
X в мг/л	152.7	119.8	81.0	29.9
Увеличенная сумма мг/л	150	120	80	30
Степень извлечения	101.8	99.8	101.3	99.7
n	25	23	25	23
Выбросы	1	3	1	3
Повторяемость s_r мг/л	1.92	1.55	1.25	0.58
RSD_r %	1.3	1.3	1.5	1.9
Коэффициент Горвица	0.17	0.17	0.19	0.20
r мг/л	5.4	4.3	3.5	1.6
Воспроизводимость мг/л S_R	10.52	10.03	6.14	3.26
RSD_R %	6.9	8.4	7.6	10.9
Коэффициент Горвица RSD_R %	7.5	7.8	8.3	9.6
коэффициент Горвица	0.92	1.08	0.92	1.14
R мг/л	29.5	28.1	17.2	9.1

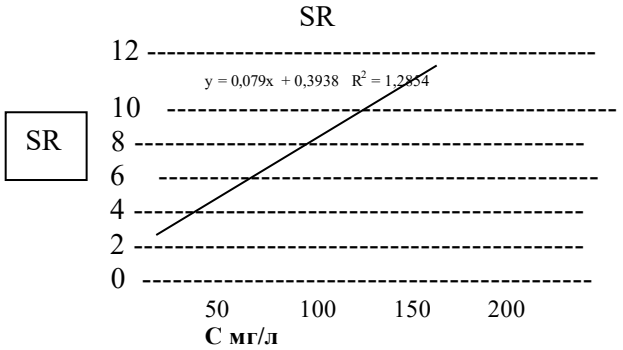




D-изоаскорбиновая кислота

	Красное вино I	Белое вино II	Красное вино III	Белое вино IV
X в мг/л	102.4	79.8	11.3	29.4
Увеличенная сумма мг/л	100	80	10	30
Степень извлечения	102.4	99.8	113.0	98.0
n	25	23	24	22
Выбросы	1	3	2	4
Повторяемость s_r мг/л	1.71	1.49	0.47	0.70
RSD_r %	1.7	1.9	4.1	2.4
Коэффициент Горвица	0.21	0.23	0.37	0.25
r мг/л	4.8	4.2	1.3	2.0
Воспроизводимость мг/л S_R	9.18	7.96	2.394	3.23
RSD_R %	9.0	10.0	21.2	11.0
Коэффициент Горвица RSD_R %	8.0	8.3	11.1	9.6
коэффициент Горвица	1.12	1.21	1.91	1.14
R мг/л	25.7	22.3	6.7	9.0





12. БИБЛИОГРАФИЯ

B. Seiffert, H. Swaczyna, I. Schaefer (1992): Deutsche Lebensmittelrundschau, 88 (2) p. 38-40

C. Fauhl: Simultaneous determination of L -ascorbic acid and D ±iso-ascorbic acid (erythorbic acid) in wine by HPLC and UV-detection ± OIV FV 1228, 2006

МЕТОД OIV-MA-AS313-23 **МЕТОД IV типа**

Идентификация L-винной кислоты как промышленного или органического происхождения
путем измерения ее активности ^{14}C
(Резолюция Oeno 12/2008)

1. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Этот метод может быть использован для определения винной кислоты как органического или промышленного происхождения, а в случаях их смеси - для определения соответствующих пропорций двух типов. В этих ситуациях метод позволяет обнаруживать L(+)-винную кислоту органического происхождения в количествах ниже 10%.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

В большинстве случаев коммерчески доступная винная кислота промышленного происхождения является продуктом виноделия. Гидрогенотартрат калия, присутствующий в осадке вина, экстрагируется и продается в форме L-винной кислоты. Таким образом, концентрация ^{14}C в кислоте связана, как и в случае со спиртом, содержащимся в вине, с концентрацией ^{14}C в углекислом газе в винах того же года производства. Эта концентрация относительно высока в результате ввиду присутствия человеческого фактора.

С другой стороны, синтетическая винная кислота, получаемая из побочных продуктов ископаемого топлива, имеет гораздо более низкую или даже незначительную концентрацию ^{14}C.
Таким образом, измерение активности ^{14}C в DPM/грамм углерода (число распадов в минуту) с использованием жидкостной сцинтилляции позволяет определить происхождение, а также любую комбинацию.

3. РЕАГЕНТЫ И ПРОДУКТЫ

3.1 Реагенты

3.1.1 Сцинтилляционная жидкость, например, Insta gel Plus
3.1.2 Эталонный толуол ^{14}C с активностью, сертифицированной лабораторией для калибровки, для расчета чувствительности и эффективности машины путем определения кривая прокаливаемости.

3.1.3 ^{14}C и ^{3}H
Стандарты H и ^{12}C толуол для фонового шума, для калибровки сцинтилляционного детектора.

3.1.4 Нитрометан 99%
3.1.5 Сверхчистая вода (>18 МОм)
3.1.6 Раствор толуола ^{14}C с активностью около 430 DPM/мл, полученный путем разбавления исходного эталонного раствора ^{14}C в толуоле ^{12}C.

3.2 Стандарты

3.2.1 Определение кривой прокаливаемости
Как только сцинтиллятор будет откалиброван с использованием трех сертифицированных стандартов толуола ^{14}C, ^{3}H и ^{12}C, охлаждают кривую, используя следующую процедуру.

Готовят десяток флаконов, каждый из которых содержит 10 мл раствора 500 г/л L-винной кислоты органического происхождения в воде, затем добавляют количество толуола ^{14}C, необходимое для приблизительно 400 - 1000 DPM на флакон (при необходимости, готовят промежуточный раствор стандартного раствора в толуоле), затем добавляют по возрастающей нитрометан, например, для 12 флаконов: 0, 0, 0, 5, 10, 15, 20, 35, 50, 100, 200 и 400 мкл, а затем 10 м сцинтилляционной жидкости. Должно получиться не менее 3 образцов без содержания нитрометана.

Определяют кривую закаливания один раз в год, анализируя флаконы в порядке возрастания содержания нитрометана.
Затем кривую закаливания можно использовать для определения чувствительности или средней эффективности.

3.2.2 Определение фонового шума (тестовый бланк)

Используя L-винную кислоту органического происхождения, подоюбную используемой для расчета эффективности, определяют фоновый шум или проверяют значение для холостой пробы. Этот тест следует проводить сразу после определения кривой закаливания, затем примерно каждые три месяца.

3.2.3 Определение калибровочной кривой

Чистота L-винной кислоты промышленного и органического происхождения должна быть проверена с помощью ВЭЖХ перед проведением сцинтилляционного теста.

Калибровка с использованием смеси винной кислоты (о которой достоверно известно, что она имеет промышленное происхождение), содержащей от 0% до 100% этого типа в сочетании с органическим типом.

	Приготовление растворов 500 г/л			
	Пустой или фоновый шум	Стандарты	Внутренний стандарт	Проба
	Соответственно в мерных колбах объемом 50 мл			
Взвешивание	25 г L-винная кислота органического происхождения	25 г известных комбинаций винной кислоты промышленного растительного происхождения	Используют холостую пробу по реагенту	25 г
Растворение	Укупоривание Хорошо гомогенизируют смесь путем встряхивания и/или перемешивания			
	Приготовление сцинтилляционных смесей			
	В пластиковые флаконы добавляют соответственно			
Образец, взятый из растворов 500 г/л	10 мл с помощью объемных пипеток			
Дополнительная концентрация			100 мкм	
Дополнительная сцинтилляционная жидкость	10 мл с помощью автоматической бюретки Завинчивают крышку			
	Оставляют на 5 минут. затем анализируют в течение 500 минут.			

3.3. Внутренний контроль

3.3.1 Характер продукта, используемого для внутреннего контроля

500 г/л раствора L-винной кислоты органического происхождения обогащают толуолом ^{14}C (DPM<100)
Фоновый шум следует определять с использованием того же раствора L-винной кислоты органического происхождения.

3.3.2 Характер внутреннего контроля
Измерение добавленной концентрации обеспечивает проверку отсутствия спектральных помех в исследуемой среде.

3.3.3 Пределы внутреннего контроля

Пределы контроля зависят от используемого оборудования: допустимое значение до 5%.

3.3.4 Частота и порядок проведения проверок

Один раз в месяц при частом использовании. Либо следует проверять сцинтиллятор после проведения каждого анализа. Такая же проверка также выполняется при каждой замене сцинтилляционной жидкости или после определения новой кривой закаливания.

3.3.5 Правила принятия решений в зависимости от результатов внутреннего контроля

Если результаты выходят за пределы внутреннего контроля, откалибровывают сцинтиллятор после проверки протокола, затем повторяют внутренний контроль. Если калибровка точна, но новое измерение внутреннего контроля не отрегулировано, следует создать новую кривую закаливания и выполнить новый контроль.

4. АППАРАТУРА

4.1 Жидкостный сцинтилляционный спектрометр с компьютером и принтером, предварительно откалиброванный с использованием кривой закаливания, установленной с помощью нитрометана

4.2 Одинаковые флаконы с низким содержанием калия (40 тыс.) с завинчивающейся пробкой и низким фоновым шумом

4.3 Две градуированные пипетки объемом по 10 мл

4.4 Автоматическая распределительная бюретка, адаптированная к завинчивающейся крышке бутылки для сцинтилляции жидкости.

4.5 Химико-лабораторное стекло

1) 5. ОБРАЗЦЫ

если требуется, перед проведением сцинтилляционного анализа можно проверить чистоту образцов с помощью ВЭЖХ.
Готовят 500 г/раствор образца, подлежащего анализу, в сверхчистой воде.

	Приготовление растворов 500 г/л		
	Пустой или фоновый шум	Стандарты	Внутренний стандарт
	Соответственно в мерных колбах объемом 50 мл		
Взвешивание	25 г L-винная кислота органического происхождения	25 г известных комбинаций винной кислоты промышленного растительного происхождения	Используют холостую пробу по реагенту
Растворение	Укупоривание		
	Хорошо гомогенизируют смесь путем встряхивания и/или перемешивания		
	Приготовление сцинтилляционных смесей		
	В пластиковые флаконы добавляют соответственно		
Образец, взятый из растворов 500 г/л	10 мл с помощью объемных пипеток		
Дополнительная концентрация			100 мкм
Дополнительная сцинтилляционная жидкость	10 мл с помощью автоматической бюретки		
	Завинчивают крышку и сильно встряхивают		
	Оставляют на 5 минут. затем анализируют в течение 500 минут.		
Примечание	Каждые 5-10 образцов обрабатывают 0 % -ной промышленной винной кислотой, т.е. 10 мл органической винной кислоты и 10 мл сцинтилляционной жидкости.		
	Измеряют фоновый шум после завершения цикла анализа		

6. ПОРЯДОК РАСЧЕТОВ

Измерения приводятся в зависимости от числа импульсов в минуту CPM, но подлежат преобразованию в DPM / грамм углерода

6.1 Результаты:

Расчет удельной радиоактивности образца ^{14}C в ДПМ/грамм углерода:

$$A = \frac{(X - X') \; x \; 100 \; x \; 3.125(1)}{Rm \; x \; m}$$

A: радиоактивность, распад в минуту на грамм углерода
- X: CPM образца
- X': CPM для ископаемой L-винной кислоты, используемой для фонового шума
- m: масса винной кислоты в образце объемом 10 мл из раствора 500 г/л, т.е. в 5 г кислоты
- Rm: средняя эффективность, выраженная в процентах

На каждый грамм углерода приходится 3,125 грамма винной кислоты (отношение молярной массы кислоты (150 г/моль) к общей массе углерода (или 4 * x 12 = 48 г/моль)

Результат выражается с точностью до одного знака после запятой.

6.2 Проверка результатов с использованием внутреннего контроля:

Проверку следует проводить путем сравнения значений, полученных в § 3.5.1, с результатом, полученным методом добавленной концентрации. Если разница существенна (> 5 %), следует перевести значения CPM в значения DPM, как показано ниже:

$$\text{Пересчитанный DPM} = \frac{\boldsymbol{CPM}}{\boldsymbol{Rm}}$$

при этом средняя эффективность рассчитывается в зависимости от кривой закаливания.

Два результата не должны отличаться более чем на 5% от их среднего значения. Если возникает подобная ситуация, следует произвести анализ образца повторно, удвоив количество внутреннего стандарта.
Сравнивают 2 полученных результата со стандартными растворами: если они находятся в границах погрешности 5 % от среднего значения 2, фиксируют средний результат.

Примечание: в данном случае это означало бы, что закаливание образца имеет настолько высокие показатели, что прямой анализ не может быть использован.

6.3 Погрешность

Значения погрешности, полученные в стандартных условиях испытаний, составляют +/-0,7 DPM /грамм углерода.

7. ВАЛИДАЦИЯ ПУТЕМ СРАВНЕНИЯ С ЭТАЛОННЫМ МЕТОДОМ

7.1 Сущность метода

Винная кислота превращается в CO_2 путем сжигания, а затем превращается в бензол; Затем измерение проводится с помощью жидкостной сцинтилляции.
После прохождения предварительной обработки, предназначенной для устранения любых загрязнений, CO_2 из образца преобразуется в бензол в соответствии с приведенной ниже цепочкой реакций**:**

$$C + O_2 \Rightarrow CO_2 \quad (1)$$

$$CaCO_3 + 2\ HCl \Rightarrow CO_2 + H_2O + Ca^{2+} + 2Cl^- \quad (2)$$

$$800°C$$

$$CO_2 + 10\ Li \Rightarrow Li_2C_2 + 4\ Li_2O \quad (3)$$

$$Li_2C_2 + 2\ H_2O \Rightarrow C_2H_2 + 2\ LiOH \quad (4)$$

Al_2O_3 вместе с Cr^{3+} и V

$$3\ C_2H_2 \Rightarrow C_6H_6 \quad (5)$$

(1) Органический образец: углерод, промытый кислородом плюс источник тепла (или путем
сжигания в присутствии кислорода под давлением), образуют двуокись углерода из образца (CO_2).

(1) Минеральный образец (морские или континентальные карбонаты, вода и т.д.): карбонат подвергается воздействию чистой соляной кислоты (HC) с образованием двуокиси углерода (CO_2) из образца плюс вода и ионизированный кальций.

(2) Воздействие CO_2 на металлический литий, нагретый до температуры от +600 °C до +800 °C, приводит к образованию карбида лития и оксида лития (-Li_2O).

(4) Действие воды (гидролиз) на карбид лития приводит к образованию ацетилена (C_2H_2), гидроксида лития. Необходимо использовать воду, не содержащую трития и радона.

(5) Тримеризация ацетилена на хромированной подложке катализатора на основе алюминия при температуре около 185°C приводит к образованию бензола (C_6H_6).

7.2 Проведение исследования:
Диоксид углерода (CO_2) из образца, полученный либо путем сжигания, горения, либо кислотного воздействия, сохраняется в накопительном цилиндре. Необходимое количество лития (литий = катализатор химического превращения) помещается в никелевую капсулу, которая затем помещается на дно камеры тепловой реакции. Внутри камеры создается вакуум, и ее нижняя часть нагревается, в то время как верхняя часть охлаждается по бокам с помощью перегородки для циркуляции воды.

7.2.1 Науглероживание.

Примерно через один час нагрева температура достигает 650°C. Затем CO_2 можно привести в контакт с расплавленным литием. Количество лития всегда выше по отношению к количеству углерода в образце. Избыточное количество лития для использования по отношению к стехиометрическим условиям варьируется от 20% до 100% в зависимости от разных источников.

Химическая реакция (науглероживание или "захват") происходит почти мгновенно, и первые несколько минут захвата являются наиболее важными в процессе науглероживания.

Реакция протекает **экзотермически** (температура повышается на 200°C). Науглероживание происходит довольно быстро и считается, что стадия науглероживания наступает после первых 20 минут, но нагрев продолжается в течение 45-50 минут, чтобы устранить любые следы **радона** (побочного продукта урана), который может быть смешан с двуокисью углерода.

7.2.2 Охлаждение

По завершении периода обработки (нагревания) реакционным камерам дают остыть до тех пор, пока они не достигнут комнатной температуры (25-30°C).

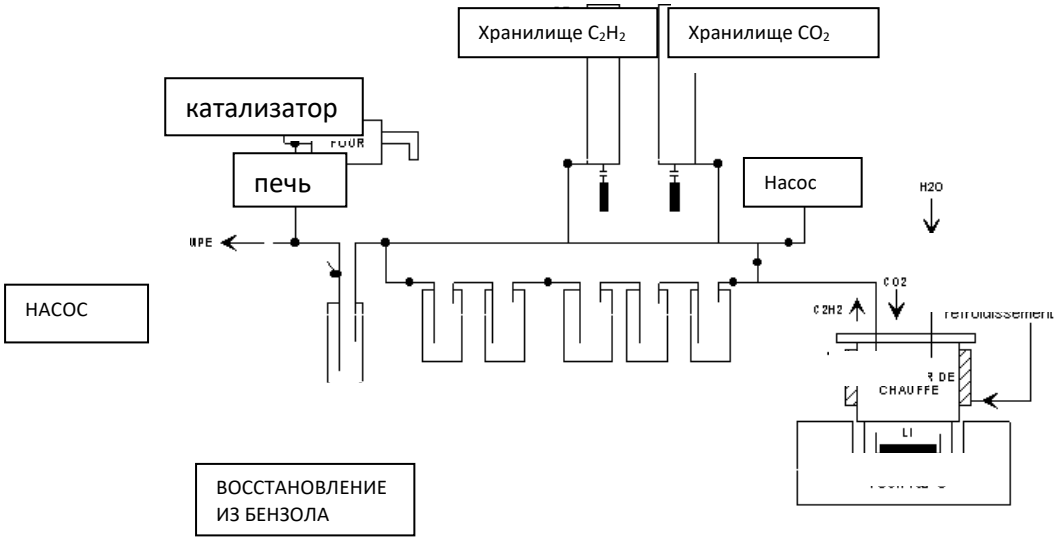
7.2.3 Гидролиз карбида лития

Вода вводится в реакционные камеры в гораздо большем количестве, чем требуется для реакции (1,5 л). Химическая реакция происходит мгновенно, и сразу же выделяется ацетилен. Эта реакция также является экзотермической (повышение температуры от +80°C до +100°C).

Полученный ацетилен затем переводят в парообразное состояние (сублимация) и улавливают на хромированной (Cr3+) алюминиевой подложке катализатора. Предварительно его сушат на воздухе в течение минимум трех часов, затем сушат в вакууме в течение двух часов при температуре +380 °C. Сушка является основополагающим фактором для удаления любой воды, оставшейся в шариках-носителях катализатора.

Тримеризация - Полимеризация ацетилена в бензол путем катализа.

Перед тримеризацией температура носителя катализатора должна упасть до +60°C - +70 °C, и поскольку эта реакция также является экзотермической, необходимо автоматическое поддержание температуры. Затем носитель катализатора повторно нагревают до +180 °C в течение 11 часов, и испаренный бензол адсорбируется, а затем улавливается в трубке-ловушке, окруженной жидким азотом. Десорбция происходит в условиях динамического вакуума. В конце эксперимента кристаллизованный бензол оставляют для повторного нагрева до комнатной температуры, чтобы он восстановил свое жидкое состояние перед использованием для подсчета.



7.4 Эталонный химический раствор для подсчета

Объем раствора, установленный на уровне 4 мл, используется в качестве эталона для подсчета сцинтилляции жидкости. Раствор содержит целевую основу из 3,52 г бензола из образца (растворителя) + сцинтилляционную жидкость (растворенное вещество), состоящую из 2 сцинтилляционных жидкостей, одной основной и одной вторичной.

Поскольку масса бензола в расчете на объем составляет **0,88 г/литр, 0,88 x 4 мл = 3,52 г.**

Основная сцинтилляционная жидкость	Бутиловый PBD
Химический состав	**(2-(4- Бифенилил)-5-(4- трет-бутилфенил)-1,3,4-оксадиазол)**
Максимальная длина волны флуоресценции	**367 нанометров**
Вторичная сцинтилляционная жидкость	**bis-MSB**
Химический состав	**1,4-Ди-(2-Метилстирил)-бензола**
Максимальная длина волны флуоресценции	**415 нанометров**
Оптическое поглощение и совместное излучение двух жидкостей:	
Максимальная длина волны поглощения	**409 нанометров**
Максимальная длина волны поглощения	**412 нанометров**

7.5 Поправка Дельта ^{13}C для фракционирования изотопов

Измерение включает поправку на фракционирование изотопов с использованием процедуры

стандартизации со стендом PDB ^{13}C **со значением - 25 ‰.**

8. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

8.1 Проведение исследования

Один образец винной кислоты полученный из вина и один образец синтетической уксусной кислоты использовали для приготовления тестовых растворов винной кислоты при 500 г/л.

Концентрации винной кислоты, полученной из вина, в растворах варьировались в интервале между 0°C и 100%.

Происхождение и чистота двух стартовых образцов были предварительно проверены с использованием эталонного метода.

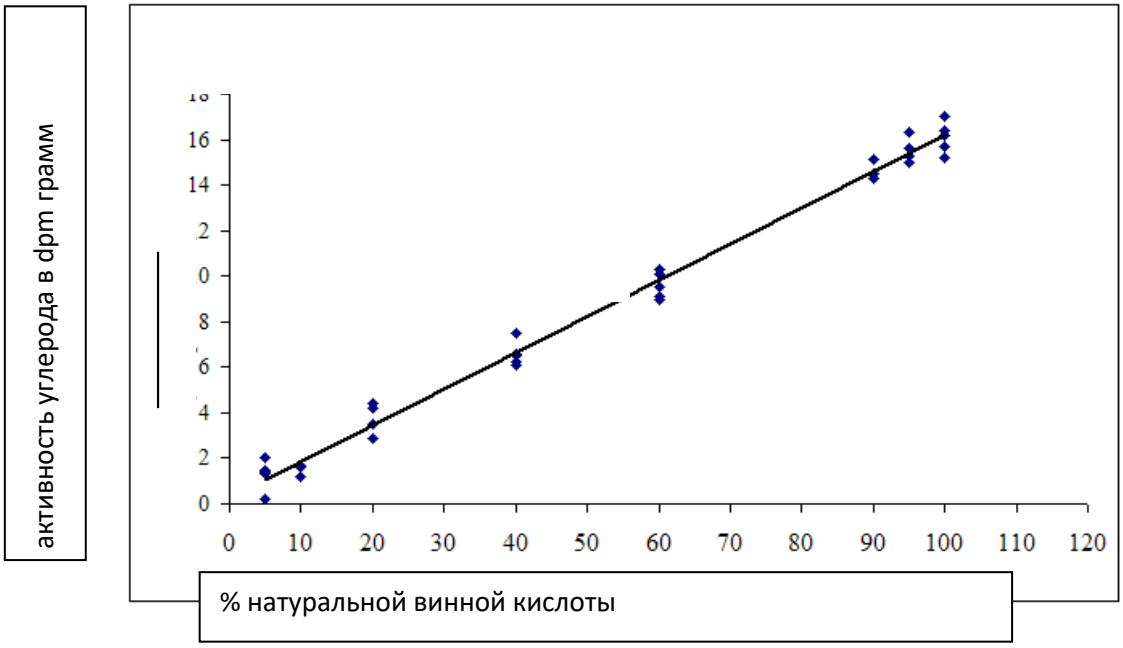
8.2 Результаты:

Результаты приведены в таблице и диаграмме ниже:

% ВИННОЙ КИСЛОТЫ ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ ВИНА

ФАКТИЧЕСКАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ	РЕЗУЛЬТАТЫ АЛЬТЕРНАТИВНОГО МЕТОДА	РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ЭТАЛОННОГО МЕТОДА
0	0 и 0	0
10	3.5 и 6.0	12
20	11.4 и 12	22
30	24.6 и 25.4	31
40	34.7 и 38	40
50	41.4 и 50.6	50
60	57.8 и 58.8	63
70	60 и 63.3	70
80	81	81
85	84	86
90	88	91
95	94	96
100	100	100

Альтернативный способ ^{14}C активность, связанная с концентрациями содержания L-винной кислоты органического


активность углерода в dpm грамм
16
14
2
0
8
6
4
2
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
% натуральной винной кислоты

8.3 Прецизионность, достоверность:

Прецизионность составляет 6,9%.
Стандартное отклонение повторяемости для альтернативного метода составляет: 2,86 винной кислоты растительного происхождения.

8. БИБЛИОГРАФИЯ

Compendium of international methods of analysis of spirits and alcohols and of the aromatic fraction of beverages, Office Internationale de la Vigne et du Vin, Edition officielle, juin 1994, page 201, 204, 210 et 307.

Methods of analysis for neutral alcohol applicable to the wine sector, EEC Regulation no. 625/2003, 2 April 2003, Journal Officiel des communautés européennes 15 May 1992, n°L130, p18. (Journal Officiel, 8 April 2003, N° L90, p4).

J. GUERAIN and S. TOURLIERE, Radioactivité carbone et tritium dans les alcools, Industries Alimentaires et Agricoles ± 92nd year, July ± August 1975, N° 7-8

S. COHEN, B. CRESTO, S. NACHAMPASSAK, T. PAYOT, B. MEDINA, S. CHAUVET, Determination de l'origine de l'acide tartrique L(+) naturelle ou fossile par la determination de son activite C^{14} - Document OIV FV, 1238, 2006.

Определение общего содержания этанола в вине
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Метод OIV-MA-A313-24 **Метод IV типа**

(Резолюция OIV-OENO 595-2018)

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Описанный метод подходит для определения общего (свободного и связанного с диоксидом серы) этанола в вине при концентрациях от 0,2 до 80 мг/л.

1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Анализируемый элемент количественно определяют после получение производных молекулы 2,4- динитрофенилгидразин (DNPH) с последующим элюированием с использованием ВЭЖХ. Обнаружение основано на времени удерживания при длине волны 365 нм.

2. РЕАГЕНТЫ И ПРЕПАРАТЫ

2.1. 2,4-Динитрофенилгидразин (DNPH), CAS № 119-26-6, чистота ≥ 99% (ВЭЖХ)

2.2. Сульфур диоксид (SO_2), как K2S2O5, CAS № 16731-55-8, чистота ≥ 98% (ВЭЖХ)

2.3. Сульфурная кислота (H_2S0_4), CAS № 7664-93-9, чистота 95.0-98.0%

2.4. Formic acid (CH_20_2), CAS № 64-18-6, чистота ≈ 98%

2.5. Ацетонитрил (C_2H_3N), CAS № 75-05-8 чистота ≈ 99,9%

2.6. Этанал (CH_3CHO), CAS № 75-07-0 чистота ≈ 99,5%

2.7. Сверхчистая вода типа I класса ВЭЖХ, соответствующая стандартам ASTM D1193 и ISO 3696, CAS № 7732-18-5

2.8. Хлорная кислота ($HClO_4$), CAS № 7601-90-3, чистота 70%

Приготовление растворов реагентов

2.9. Свежеприготовленный раствор диоксида серы с концентрацией 1120 мг/л SO_2, полученный смешиванием 2 г/л раствора $K_2S_2O_5$ (2,2) с ультрачистой водой класса ВЭЖХ

2.10. 25% в/в раствор серной кислоты, приготовленный путем разбавления концентрированной
серной кислоты (2.3) сверхчистой водой класса ВЭЖХ

2.11. 2,8% раствор ацетонитрила, подкисленный хлорной кислотой, полученный путем разведения хлорной кислоты (2,8) в ацетонитриле (2,5)

2.12. Свежеприготовленный раствор 2,4-динитрофенилгидразина (2,1) в подкисленной ацетонитрил (2,11) в концентрации 2 г/л DNPH

2.13. Приготовление калибровочных растворов

Исходный раствор готовят путем разбавления соответствующего количества этанала (плотность = 0,785 г/мл) в сверхчистой воде класса ВЭЖХ для получения концентрации от 300 до 400 мг/л. Учитывая, что чистый этанал обладает высокой летучестью, исходный раствор следует готовить путем отбора проб постоянных объемов этанала с использованием калиброванных колб (3.1). Чтобы приготовить исходный раствор, отмеряют 10 мл чистого этанала в калиброванную колбу, переливают чистый этанал в другую калиброванную колбу объемом 20 мл и доводят до метки сверхчистой водой класса ВЭЖХ. Разбавление растворов осуществляется путем увеличения объема сверхчистой водой класса ВЭЖХ в калиброванных колбах большей емкости. Калибровочные растворы с концентрациями 10 мг/л, 30 мг/л, 50 мг/л, 70 мг/л и 100 мг/л получают путем разбавления исходного раствора в калиброванных колбах объемом 50 мл.

Требуемые объемы отбираются из исходного раствора, например, с помощью прецизионной микропипетки (3.2), и заполняются до объема сверхчистой водой класса ВЭЖХ в калиброванных колбах (3.1).

Приготовление растворителя А для анализа ВЭЖХ

2.14. 0,5% (в/в) раствор муравьиной кислоты, полученный путем разбавления концентрированной муравьиной кислоты (2,4) в сверхчистой воде класса ВЭЖХ (2,7).

2. АППАРАТУРА

3.1. Повседневная лабораторная посуда, включая калиброванные колбы класса А по 10, 20 и 50 мл, флаконы по 2 мл и контейнеры объемом 1 л для растворителей, а также пастеровские пипетки
3.2. Прецизионные микропипетки
3.3. Вихревая мешалка
3.4. Мембранные фильтры 0,45 мкм для подготовки образцов, сертифицированные для использования в ВЭЖХ
3.5. Вакуумная колба объемом 1 л (в случае, если автоматический дегазатор растворителей не
поставляется с аппаратом ВЭЖХ)
3.6. Вакуумный насос (если автоматический дегазатор растворителей не поставляется с аппаратом ВЭЖХ)
3.7. Аналитические весы с точностью ±0,0001 г
3.8. Печь с естественной конвекцией с точностью ±1°C при температуре 65°C
3.9. Аппарат ВЭЖХ с УФ-детектором, оснащенный двумя градиентными насосами и печью для нагрева колонки
3.10. Колонка C18 (250 x 4,6 мм, диаметр частиц: 4 мкм)

Примечание: Любая другая система может быть использована при условии, что этанол хорошо
отделен от других производных карбонильных соединений. Хроматографическое разрешение между пиком этанола и наибольшим соседним пиком на хроматограмме должно быть выше 1.

4. ОТБОР ПРОБ

Образцы вина следует поместить и хранить в стеклянной таре, закрытой тефлоновой пробкой, в инертной атмосфере (азот или аргон).

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дериватизация

Дериватизацию проводят в стеклянных флаконах объемом 2 мл, закрытых тефлоновыми пробками, внутрь которых последовательно добавляют: 100 мкл вина или стандартного раствора, отфильтрованного при 0,45 мкм, 20 мкл свежеприготовленного раствора диоксида серы (2,2) с концентрацией 1120 мг/л SO2, 20 мкл 25%-ной серной кислоты кислоты (2,3) и 140 мкл свежеприготовленного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в ацетонитриле в концентрации 2 г/л
DNPH (2.12).
После введения этих веществ раствор немедленно перемешивают мешалкой и помещают в духовку при температуре 65 °C на 15 минут, затем охлаждают при комнатной температуре.

Как только реакция завершена, раствор охлаждают при комнатной температуре в течение 15
минут, прежде чем вводить в аппарат для ВЭЖХ. Образцы должны быть введены менее чем через 10 часов после окончания реакции дериватизации.

Анализ ВЭЖХ
Конкретные параметры ВЭЖХ-анализа приведены ниже в качестве примера.

Нормальные условия эксплуатации:

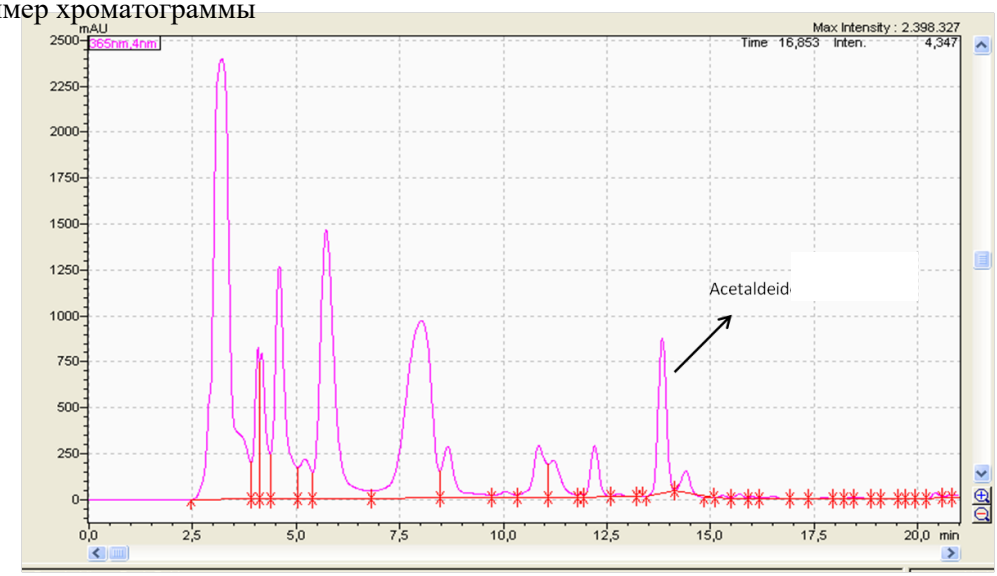
- Объем инъекции: 15 мкл
- Скорость потока: 0,75 мл/мин
- Колонка C18 (5.10)
- Растворитель для очистки инжектора: ацетонитрил
- Температура колонки: 35 °C
- Растворитель подвижной фазы A: 0,5% муравьиной кислоты в сверхчистой воде класса ВЭЖХ
- Подвижная фаза-B растворитель: ацетонитрил
- Обнаружение при 365 нм

Градиент элюирования

Программа элюирования предусматривает:

35% eluent B (0.1 s)	65% eluent A (0,1 s)
60% eluent B (8 min)	40% eluent A (8 min)
90% eluent B (13 min)	10% eluent A (13 min)
95% eluent B (15 min)	5% eluent A (15 min)
95% eluent B (17 min)	5% eluent A (17 min)
35% eluent B (21 min)	65% eluent A (21 min)
35% eluent B (25 min)	65% eluent A (25 min)

Пример хроматограммы



6. ПОРЯДОК РАСЧЕТОВ

Концентрация этанола рассчитывается на основе уравнения калибровочной кривой, полученной после введения калибровочных растворов (2.13).

7. ПАРАМЕТРЫ ТОЧНОСТИ И ВАЛИДАЦИИ

Коэффициент вариации для анализов, повторяемых в одной и той же лаборатории, должен составлять менее 6% (для интервала с концентрациями от 10 мг/л до 100 мг/л). Стандартное отклонение повторяемости составляет 2,7% для концентрации 14 мг/л, 2,98% для концентрации 18 мг/л, 4,8% для концентрации 22 мг/л и 1,3% для концентрации 60 мг/л. Диапазон линейности составляет от 0,2 до 80,0 мг/л. Предел обнаружения составляет 0,1 мг/л. Полнота извлечения в вине составляет от 92% до 102% (м/м).

8. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты выражены в мг общего этанола/л с точностью до 1 знака после запятой.

9. БИБЛИОГРАФИЯ

Behforouz, M., Bolan, J. L., and Flynt, M. S., '2, 4-Dinitrophenylhydrazones: a modified method for the preparation of these derivatives and an explanation of previous conflicting results', The Journal of Organic Chemistry, 50 (8), 1985, pp. 1186-1189.

Elias, R. J., Laurie, V. F., Ebeler, S. E., Wong, J. W., and Waterhouse, A. L., 'Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection', Analytica chimica acta, 626 (1), 2008, pp. 104-110.

Han, G., Wang, H., Webb, M. R., and Waterhouse, A. L., 'A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO 2-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS', Talanta, 134, 2015, pp. 596-602.

Метод OIV-MA-A313-25 **Метод III типа**

Определение L-молочной кислоты в винах автоматизированным ферментативным методом

(Резолюция OIV-OENO 598-2018)

1. Область применения

Этот метод позволяет определить L-молочную кислоту в вине с помощью специфического ферментативного анализа с использованием автоматического последовательного анализатора.
В данном документе сообщается о совместном исследовании, которое демонстрирует применениеметода для измерения L-молочной кислоты в диапазоне от 0,06 до 1,43 г/л.

Примечание: При необходимости каждая лаборатория, использующая этот метод, может уточнить и потенциально расширить этот диапазон посредством валидационного исследования.

2. Перекрестные ссылки

- OIV Сборник международных методов анализа: молочная кислота − ферментативный метод, OIV-MA-AS313-07,
- ISO 78-2: Химия − схемы стандартов.

3. Сущность реакции

В присутствии никотинамид аденин динуклеотида (НАД) L-молочная кислота окисляется до пирувата в реакции, катализируемой L-лактатдегидрогеназой (L-ЛДГ).
Поскольку равновесная реакция протекает в пользу лактата, необходимо удалить образовавшийся пируват, который превращается в L-аланин в присутствии L.
Эта реакция катализируется глутамат пируват трансаминазой (GPT).

$$L - lactate + НАД^{+} < \xrightarrow{L-LDH} > pyruvate + NDH + H^{+}$$

$$Pyruvate + L - glutamate < \xrightarrow{GPT} > L - alanine + \boxed{\alpha} - katoglutarate$$

Получаемый восстановленный никотинамид аденин динуклеотид (НАДН) измеряют на основе его поглощения при 340 нм. Это пропорционально количеству L-молочной кислоты.

4. Реагенты и рабочие растворы

Во время анализа − если не указано иное − используют только реагенты признанного аналитического класса и дистиллированную, деминерализованную воду.

4.1. Реагенты

4.1.1. Вода качества I или II для аналитического использования (стандарт ISO 3696)

4.1.2. Глицилглицин (CAS № 556-50-3)

4.1.3. Глутаминовая кислота (CAS № 56-86-0)

4.1.4. НАД (никотинамид аденин динуклеотид) (CAS № 53-84-9)

4.1.5. L-ЛДГ (L-лактат дегидрогеназа) (CAS № 9001-60-9)

4.1.6. ГПТ (глутамат пируват трансаминаза) (CAS № 9000-86-6)

4.1.7. L-молочная кислота, чистота ≥ 98% (CAS № -33-4)

4.1.8. Поливинилпирролидон (ПВП) (CAS № 9003-39-8)

4.1.9. Гидроксид натрия (CAS № 1310-73-2)

Примечание 1: Существуют коммерческие наборы для определения L-молочной кислоты. Пользователь должен проверить состав, чтобы убедиться, что он содержит вышеуказанные реагенты.

Примечание 2: Рекомендуется использовать ПВП для устранения любого возможного негативного воздействия танинов в вине на фермент. Если применение ПВП окажется неэффективным, лаборатория должна убедиться, что дубильные вещества вина не влияют на ферменты.

4.2. Рабочие растворы

4.2.1. А буфер с pH 10 (0,60 М глицилглицина, 0,1 М L-глутаминовой кислоты).

Подготовка может быть следующей:

- глицилглицин (4.1.2): 4,75 г.

- глутаминовая кислота (4.1.3): 0,88 г.
- ПВП (4.1.8): 1 г,
- вода для аналитических целей (4.1.1): 50 мл.

Смесь доводят до уровня pH 10 с использованием 10 M раствора гидроксида натрия, затем добавляют 60 мл воды для аналитического использования. Этот раствор стабилен в течение не менее 4 недель при температуре 2-8 °C (прибл.)

4.2.2. Рабочее решение R1 (пример):

- вода для аналитических целей (4.1.1): 12 мл.
- НАД (4.1.4): 420 мг.

Этот раствор стабилен в течение не менее 4 недель при температуре 2-8 °C (прибл.)

4.2.3. Рабочий раствор R2 (пример):

- вода для аналитических целей (4.1.1): 1,2 мл,
- L-ЛДГ (4.1.5): 7600 Ед,
- GPT (4.1.6): 2200 Ед.

4.3. Калибровочные растворы

Чтобы обеспечить максимально возможную связь с Международной системой единиц (СИ), диапазон калибровки следует создавать с использованием чистых растворов L-молочной кислоты, приготовленных путем взвешивания и охватывающих диапазон измерений.

5. Аппаратура

5.1. Анализатор

5.1.1. Тип оборудования

Автоматический последовательный анализатор, оснащенный спектрофотометром с УФ - детектором. Температура реакции должна строго контролироваться (обычно 37°C). Реакционные кюветы изготавливаются из стекла, метакрилата или кварца. К оборудованию применяется программное обеспечение, обеспечивающее его работу, сбор данных и полезные вычисления.

5.1.2. Показатель поглощения

Концентрация анализируемых веществ напрямую связана с разницей поглощения, измеряемой спектрофотометром. Точность измерения поглощения должна составлять не менее 0,1 единицы поглощения (AU). Предпочтительно не использовать значения поглощения выше 2,0.

5.1.3. Точность собранных объемов

Точность объемов реагентов и образцов, собранных пипетками анализатора, влияет на результат измерения. Рекомендуется осуществлять контроль качества результатов с использованием соответствующих стратегий (например, в соответствии с руководствами, опубликованными OIV)

5.1.4. Продолжительность и температура реакции

Как правило, время реакции составляет 10 минут, а температура - 37°C. Некоторые части устройства могут использовать несколько иные значения.

5.1.5. Длина волны

Длина волны максимального поглощения НАДН, образующегося в результате реакции, составляет 340 нм.

5.2. Баланс

Должен быть откалиброван в соответствии с Международной системой единиц с точностью 1 мг.

5.3. pH-метр

5.4. **Мерная посуда**

Мерная посуда для приготовления реагентов и калибровочных растворов относится к классу A.

6. Отбор проб

6.1. Подготовка образцов сусла и неигристых вин

В большинстве случаев образцы вина и сусла могут быть проанализированы без предварительной подготовки. В некоторых случаях может быть введен препарат:

- Для образцов с высокой мутностью следует использовать фильтрацию или центрифугирование.
- Для значений, превышающих диапазон измерений, следует использовать разбавление пробы (ручное или автоматическое) водой для аналитических целей.

6.2. Подготовка образцов игристого вина, содержащего CO_2

В образцах игристого вина, содержащих CO_2, может наблюдаться «эффект пузырьков». Они должны быть предварительно дегазированы путем перемешивания в вакууме, ультразвуковой обработки или любым другим способом, обеспечивающим требуемую дегазацию.

7. Проведение исследования

Учитывая, что могут использоваться различные анализаторы, рекомендуется строго соблюдать условия использования, предусмотренные производителем. То же относится к различным ферментативным наборам, доступным на рынке.

Процедура происходит следующим образом:

1. Образец (образцы) помещают в реакционную кювету.
2. Затем в кювету добавляют рабочий раствор R1 (4.2.2).
3. Эти два вещества смешивают. Чтобы гарантировать стабильность поглощения следует некоторое время подождать. Период задержки может длиться от 1 до 5 минут и определяется лабораторией в соответствии с характеристиками используемого оборудования.
4. Добавляют рабочий раствор R2 (4.2.3), и происходит реакция.

В качестве примера, количества различных веществ могут быть следующими:

- образец: 2,5 мкл,
- буфер (80%) и R1 (20%): 120 мкл,
- R2: 15 мкл.

При помощи специального оборудования производятся регулярные измерения, которые позволяют получить кривую реакции, пример которой приведен на рисунке 1.

Кривая реакции. Пример

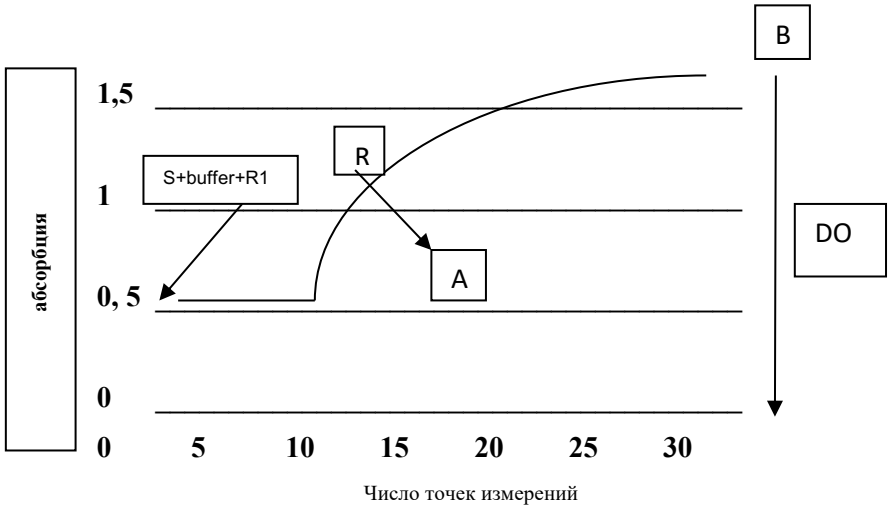


Рисунок 1: Кривая реакции

Оборудование позволяет выбирать точки считывания для требуемой разницы в поглощении, например A и B на рисунке 1.

Измерение, используемое для определения результата, выглядит следующим образом:

$$\Delta DO = (\text{Поглощение B} - \text{Поглощение A})$$

Чтобы соотнести это значение ΔDO с желаемой концентрацией L-молочной кислоты, проводится регулярная калибровка прибора с использованием калибровочных растворов минимум в 3 точках, охватывающих используемый диапазон измерений. В примере, приведенном на рисунке 2 калибровочная кривая представляет собой прямую линию для значений от 0 до 1,22 г/л молочной кислоты. В этом случае для более высоких значений предпочтительно проводить разбавление растворов.

Помимо этого используется заготовка для реагентов, содержащая все реагенты, но без образца (точка 0 от калибровки).

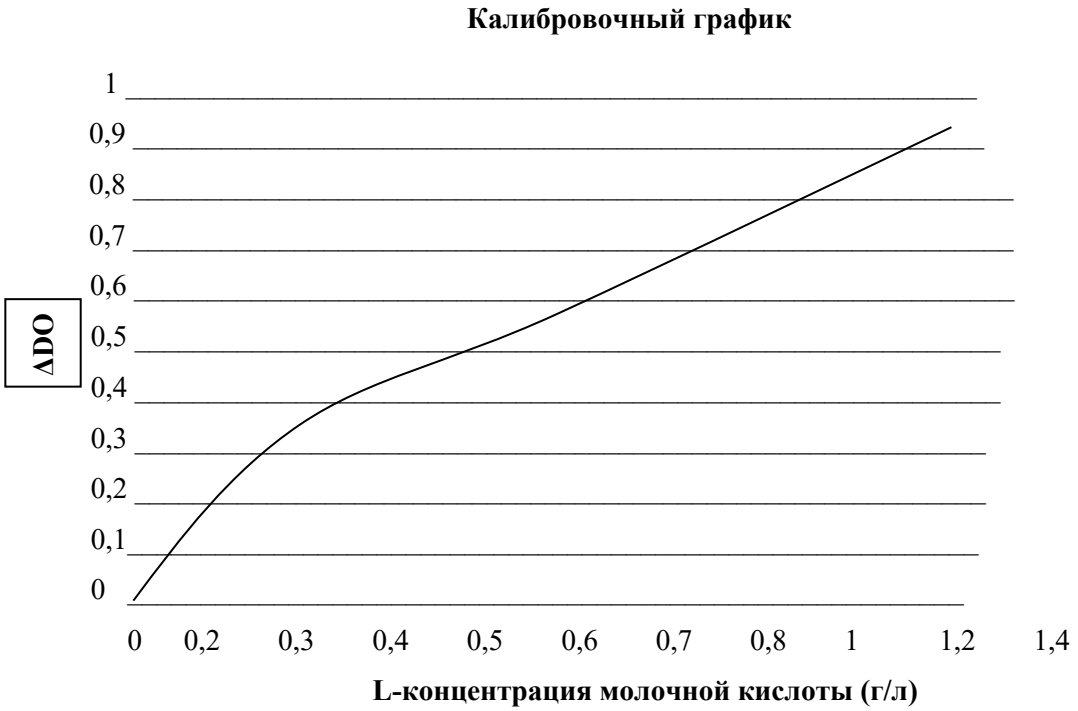


Рисунок 2: **Калибровочный график**

Калибровочная кривая может быть порядка 1 *(Концентрация = a.ΔDO+b)*, но в данном методе она более общего порядка 2 (*Концентрация = a.ΔDO²+bΔDO+c*). При использовании калибровочной кривой порядка 2 лаборатория должна позаботиться об ограничении области калибровки, чтобы сохранить достаточную чувствительность метода (риск искажения кривой при высоких концентрациях). Полученное конечное значение следует умножить на любой используемый коэффициент разбавления.

Полученное конечное значение следует умножить на любой используемый коэффициент разбавления.

8. Выражение результатов

Результаты выражены в г/л L-молочной кислоты до 2 d.p.

10. Прецизионность

Межлабораторная воспроизводимость

RSD_R = 7% (from 0.5 г/л)
CV_R% (k=2) = 2·RSD_R= 14%, (from 0.5 г/л)

Воспроизводимость

RSD_r = 2% (from 0.5 г/л)
CV_r% (k=2) = 2·RSD_r = 4% (from 0.5 г/л)

Предел количественной оценки

Подтвержденный LOQ = 0,06 г/л
(Концентрация, где CV_R% (k=2) = 60%)

ПРИЛОЖЕНИЕ
Результаты межлабораторных испытаний

Совместное исследование

В общей сложности 16 лабораторий из разных стран мира приняли участие в совместном исследовании, организованном в 2016 году.

Название лаборатории	Страна
Miguel Torres S.A.- Finca Mas La Plana	Испания
Estación Enológica de Castilla y León	Испания
INGACAL -Consellería do Medio Rural Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	Испания
Estación Enológica de Haro	Испания
Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes	Португалия
Laboratoires Dubernet	Франция
Laboratoire Dicœnos Rhône	Франция
Laboratoire Natoli	Франция
SCL Montpellier	Франция
Agricultural institute of Slovenia	Словения
Fachbereich: Wein, Weinüberwachung - Chemisches und Veterinärunterchungsamt Karlsruhe	Германия
HBLAuBA Wein - und Obstbau	Австрия
Landesuntersuchungsamt Mainz	Германия
Hochschule GEISENHEIM University Institut Weinanalytik und Getränkeforschung	Германия
Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare - Centro Trasferimento Tecnologico - Fondazione Edmund Mach	Австрия
Unione Italiana Vini soc. Coop.	Австрия

Для анализа использовали 2x10 контрольные дублирующие пробы с 1 повторением. Вина, подвергнутые анализу - это вина из Франции и Португалии, сухие и ликерные вина.

Проба		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		десертное вино		сухое вино		сухое вино		сухое вино		сухое вино		сухое вино		сухое вино		сладкое вино		сладкое вино		сладкое вино	
Позиция		1	9	2	13	3	4	5	15	6	10	16	20	7	11	12	17	8	19	14	18
Лаб. 3	Экз. 1	0.17	0.14	0.04	0.04	0.49	0.49	0.68	0.73	1.03	1.06	*1.03*	*1.09*	1.34	1.31			0.12	0.12	1.36	1.34
	Экз. 2	0.18	0.17	0.01	0.02	0.43	0.50	0.68	0.68	1.01	1.04	*1.05*	*1.07*	1.28	1.26			0.12	0.11	1.24	1.32
Лаб. 6	Экз. 1	0.19	0.19			0.55	0.55	0.77	0.73	1.15	1.11	*1.09*	*1.09*	1.42	1.39	0.04	0.03	0.14	0.13	1.47	1.43
	Экз. 2	0.14	0.14			0.52	0.52	0.75	0.71	1.16	1.11	*1.09*	*1.10*	1.44	1.41	0.03	0.03	0.08	0.07	1.50	1.45
Лаб. 7	Экз. 1	0.16	0.17	0.04	0.04	0.51	0.52	0.72	0.73	1.09	1.05	*1.01*	*1.07*	1.33	1.36	0.03	0.03	0.12	0.13	1.42	1.42
	Экз. 2	0.17	0.17	0.03	0.04	0.50	0.50	0.72	0.72	1.05	1.09	*1.04*	*1.08*	1.34	1.32	0.02	0.03	0.12	0.12	1.44	1.43
Лаб. 9	Экз. 1	0.15	0.14			0.50	0.54	0.70	0.70	1.09	1.10	*1.06*	*1.06*	1.31	1.27			0.11	0.07	1.41	1.43
	Экз. 2	0.14	0.15			0.50	0.52	0.69	0.74	1.10	1.08	*1.01*	*1.01*	1.29	1.27		0.01	0.10	0.12	1.37	1.33
Лаб. 12	Экз. 1	0.17	0.18	0.08	0.08	0.51	0.51	0.74	0.75	1.06	1.04	*1.04*	*1.02*	1.34	1.34			0.16	0.16	1.40	1.40
	Экз. 2	0.17	0.18	0.08	0.08	0.51	0.51	0.74	0.76	1.04	1.00	*1.03*	*1.00*	1.34	1.36			0.17	0.18	1.40	1.42
Лаб. 13	Экз. 1	0.16	0.16	0.05	0.05	0.49	0.48	0.71	0.72	1.00	1.08	*1.01*	*1.01*	1.30	1.42	0.03	0.03	0.12	0.12	1.39	1.41
	Экз. 2	0.16	0.17	0.05	0.05	0.49	0.50	0.71	0.73	1.03	1.05	*1.01*	*1.05*	1.29	1.33	0.02	0.02	0.13	0.12	1.37	1.37
Лаб. 14	Экз. 1	0.15	0.14	0.02	0.02	0.61	0.61	0.79	0.79	1.20	1.21	*1.23*	*1.24*	1.53	1.49	0.01	0.01	0.10	0.10	1.59	1.58
	Экз. 2	0.14	0.14	0.02	0.02	0.60	0.61	0.79	0.79	1.22	1.21	*1.24*	*1.24*	1.53	1.52	0.01	0.01	0.10	0.10	1.59	1.59
Лаб. 15	Экз. 1	0.40	0.43	0.09	0.08	1.00	0.98	1.03	1.07	1.69	1.68	*1.60*	*1.60*	2.04	2.10	0.06	0.07	0.24	0.19	2.07	2.06
	Экз. 2	0.43	0.36	0.03	0.03	0.95	0.99	1.05	1.09	1.64	1.68	*1.62*	*1.63*	2.04	2.03	0.04	0.01	0.16	0.19	2.17	2.01
Лаб. 16	Экз. 1	0.17	0.17	0.03	0.03	0.53	0.53	0.73	0.75	1.14	1.12	*1.08*	*1.09*	1.37	1.38	0.03	0.02	0.12	0.13	1.50	1.44
	Экз. 2	0.17	0.17	0.03	0.05	0.55	0.53	0.74	0.74	1.15	1.13	*1.06*	*1.08*	1.40	1.37	0.04	0.02	0.12	0.12	1.46	1.45

проба		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		десертное вино		сухое вино		сухое вино		сухое вино		сухое вино		сухое вино		сухое вино		сладкое вино		сладкое вино		сладкое вино	
позиция		1	9	2	13	3	4	5	15	6	10	16	20	7	11	12	17	8	19	14	18
Лаб. 17	Экз. 1	0.12	0.13	0.02	0.02	0.46	0.45	0.65	0.71	1.01	1.01	*1.03*	*1.07*	1.20	1.18	0.01	0.01	0.10	0.09	1.39	1.36
	Экз. 2	0.12	0.13	0.03	0.03	0.46	0.48	0.69	0.70	1.05	1.07	*1.04*	*1.03*	1.29	1.32	0.01	0.01	0.08	0.10	1.37	1.37
Лаб. 18	Экз. 1	0.16	0.15	0.14	0.04	0.44	0.43	0.64	0.63	0.95	0.95	*0.92*	*0.92*	1.19	1.17	0.03	0.03	0.11	0.11	1.23	1.25
	Экз. 2	0.14	0.15	0.04	0.04	0.44	0.45	0.63	0.63	0.94	0.95	*0.92*	*0.91*	1.18	1.17	0.03	0.03	0.11	0.11	1.26	1.26
Лаб. 19	Экз. 1	0.16	0.16	0.04	0.04	0.55	0.58	0.79	0.80	1.18	1.21	*1.12*	*1.14*	1.42	1.45	0.02	0.02	0.13	0.13	1.49	1.50
	Экз. 2	0.16	0.16	0.04	0.04	0.56	0.56	0.78	0.74	1.13	1.15	*1.13*	*1.14*	1.43	1.46	0.03	0.02	0.13	0.13	1.51	1.51
Лаб. 20	Экз. 1	0.17	0.18	0.04	0.04	0.53	0.53	0.74	0.75	1.11	1.09	*1.06*	*1.07*	1.30	1.32	0.03	0.03	0.13	0.13	1.39	1.42
	Экз. 2	0.17	0.18	0.04	0.04	0.53	0.53	0.74	0.75	1.11	1.09	*1.06*	*1.07*	1.30	1.32	0.03	0.03	0.13	0.13	1.39	1.42
Лаб. 21	Экз. 1	0.18	0.18	0.05	0.05	0.56	0.56	0.79	0.80	1.17	1.12	*1.19*	*1.20*	1.46	1.50	0.05	0.05	0.13	0.13	1.54	1.58
	Экз. 2	0.17	0.18	0.05	0.05	0.56	0.56	0.79	0.81	1.19	1.21	*1.20*	*1.23*	1.47	1.48	0.05	0.05	0.13	0.13	1.55	1.57
Лаб. 22	Экз. 1	0.24	0.23	0.05	0.06	0.53	0.51	0.70	0.72	1.04	1.10	*1.01*	*1.00*	1.29	1.28	0.05	0.04	0.13	0.16	1.38	1.40
	Экз. 2	0.24	0.22	0.05	0.05	0.52	0.52	0.70	0.74	1.04	1.06	*1.06*	*1.03*	1.29	1.29	0.05	0.04	0.15	0.14	1.43	1.41

Таблица полученных данных. Значения, выделенные жирным шрифтом, соответствуют значениям отклонений в соответствии с критерием Кокрана (отклонения от нормы) и уровню значимости 2,5% (односторонний критерий) и тесту Граббса (отклонения от среднего значения) с уровнями значимости 2,5% (двусторонний критерий).

Примечание: Отсутствующие значения не были предоставлены соответствующей лабораторией.

Проба	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
№ выбранной лаборатории	12	12	13	14	14	14	12	12	12	12
Количество повторений	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Мин.	0.13	0.02	0.44	0.63	0.95	0.92	1.18	0.01	0.09	1.25
Макс.	0.18	0.08	0.61	0.80	1.21	1.24	1.52	0.05	0.17	1.59
Общее среднее значение	0.16	0.04	0.52	0.73	1.09	1.07	1.36	0.03	0.12	1.43
Дисперсия воспроизводимости	0.00005	0.00003	0.00011	0.00028	0.00053	0.00035	0.00032	0.00002	0.00004	0.00028
Межлабораторное стандартное отклонение	0.02	0.02	0.04	0.04	0.07	0.08	0.10	0.01	0.02	0.09
Разница в воспроизводимости	0.0003	0.0003	0.0020	0.0021	0.0057	0.0067	0.0093	0.0002	0.0004	0.0083
Стандартное отклонение повторяемости	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.01	0.02
Предельное значение r	0.02	0.02	0.03	0.05	0.06	0.05	0.05	0.01	0.02	0.05
Повторяемость RSD_r	4.3%	14.1%	2.0%	2.3%	2.1%	1.8%	1.3%	16.9%	5.0%	1.2%
Стандартное отклонение воспроизводимости	0.02	0.02	0.04	0.05	0.08	0.08	0.10	0.01	0.02	0.09
Предельное значение R	0.05	0.05	0.13	0.13	0.21	0.23	0.27	0.04	0.06	0.26

Проба	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
№ выбранной лаборатории	12	12	13	14	14	14	12	12	12	12
Воспроизводимость RSD_r	10.5 %	40.0 %	8.5 %	6.4 %	7.0 %	7.6 %	7.1 %	50.8 %	16.5 %	6.4 %
RSD_r по Горвицу	4.92	6.03	4.12	3.92	3.69	3.70	3.57	6.46	5.11	3.54
r – по Горвицу	0.87	2.33	0.49	0.59	0.57	0.48	0.37	2.62	0.98	0.33
RSD_r по Горвицу	7.46	9.13	6.24	5.93	5.58	5.60	5.40	9.79	7.74	5.36
R - по Горвицу	1.41	4.38	1.36	1.07	1.25	1.36	1.32	5.19	2.13	1.19

Таблица полученных результатов

Примечание: Результаты по образцам B и H следует принимать с осторожностью из-за очень низких уровней концентрации, которые ниже предела количественной оценки.

Совместное исследование L-молочной кислоты

R предел в зависимости от концентрации

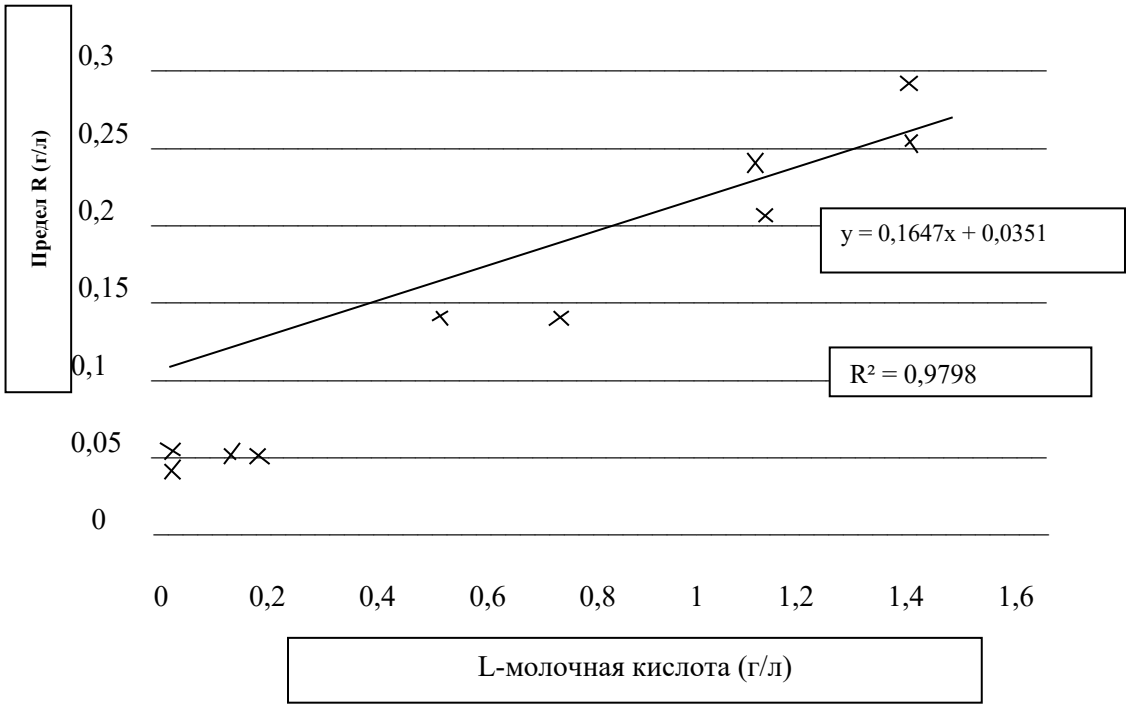


Рисунок 3: Предел R в зависимости от концентрации

Совместное исследование L-молочной кислоты

Межлабораторная воспроизводимость RSD_R% в зависимости от концентрации

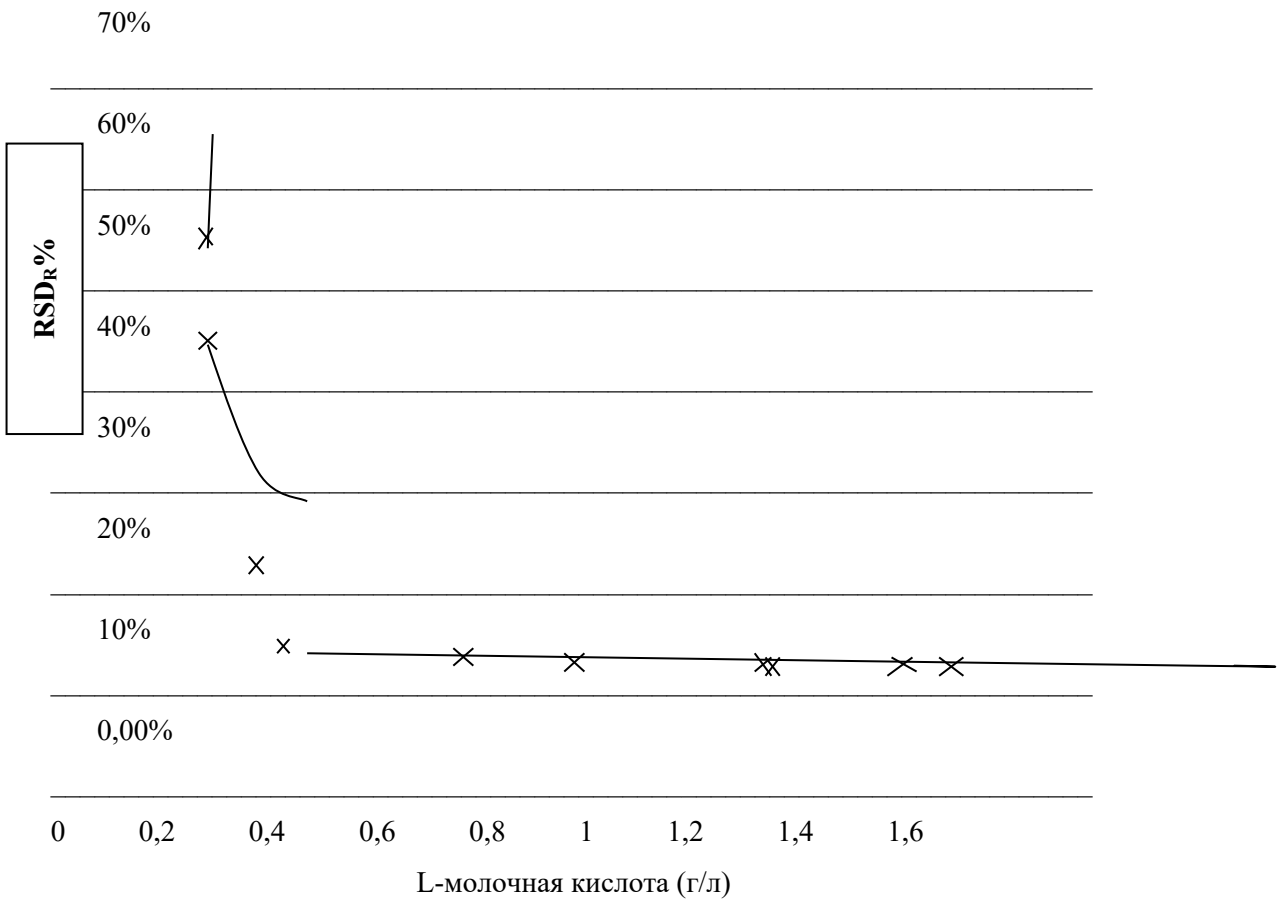


Рисунок 4: Межлабораторные показатели RSD_R % в зависимости от концентрации.

Моделирование процесса: $\mathbf{RSD_R\% = 0{,}758 \cdot C^{(-1.216)} + 7}$

Метод OIV-MA-A313-26 Метод III типа

Определение L-яблочной кислоты в вине автоматизированным ферментативным методом

(Резолюция OIV-OENO 599-2018)

1. Область применения

Данный метод позволяет определить L-яблочную кислоту в вине с помощью специфического ферментативного анализа с использованием автоматического последовательного анализатора.
В документе представлены материалы совместного исследования с применением метода измерения L-яблочной кислоты в пределах от 0,12 до 2,3 г/л.

Примечание: Лаборатории, используемые данный метод, могут при необходимости внести уточнения для большего диапазона измерений после проведенного доказательного исследования.

2. Нормативные ссылки

- МОВВ *Сборник международных методов анализа*: L-яблочная кислота – ферментативный метод, OIV-MA-AS313-11,
- ISO 78-2: Химия – Макеты стандартов.

3. Сущность реакции

В присутствии никотинамидадениндинуклеотида (НАД) L-яблочная кислота окисляется до оксалоацетата в реакции, катализируемой L-малатдегидрогеназой (L-МДГ). Поскольку равновесная реакция протекает в пользу малата, необходимо удалить образовавшийся оксалоацетат, который превращается в L-аспартат в присутствии L-глутамата. Эта реакция катализируется глутамат-оксалоацетат-трансаминазой (ГОТ).

$$L-malate + NAD \xrightarrow{L-MDH} oxaloacetate + NADH + H^{+}$$

$$oxaloacetate + L-glutamate \xrightarrow{GOT} L-aspartate + \alpha-ketoglutarate$$

Получаемый восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) измеряют на основе его поглощения при 340 нм. Это пропорционально количеству L-яблочной кислоты.

4. Реагенты и рабочие растворы

Во время анализа – если не указано иное – используют только реагенты признанного аналитического класса и воду дистиллированную, деминерализованную или эквивалентной чистоты.

4.1. Реагенты

4.1.1. Вода I или II степени чистоты для аналитических исследований (стандарт ISO 3696);

4.1.2. Глицилглицин (CAS № 556-50-3);

4.1.3. Глутаминовая кислота (CAS № 56-86-0);

4.1.4. НАД (никотинамидадениндинуклеотид) (CAS № 53-84- 9);

4.1.5. L-МДГ (L-малатдегидрогеназа) (CAS № 9001-64-3);

4.1.6. ГОТ (глутамат-оксалоацетаттрансаминаза) (CAS № 9000-97-9);

4.1.7. L-яблочная кислота, чистота ≥ 95% (CAS № 97-67-6);

4.1.8. Дополнительно: поливинилпирролидон (ПВП) (CAS № 9003-39-8) или возможен ПВПП (CAS № 25249-54-1);

4.1.9. Гидроксид натрия (CAS № 1310-73-2).

Примечание 1: Существуют коммерческие наборы для определения L-яблочной кислоты. Пользователю необходимо проверить состав чтобы убедиться в наличии
вышеуказанных реагентов.
Примечание 2: Рекомендуется использовать ПВП для устранения в вине любого возможного негативного воздействия танинов на молекулы ферментативного белка.

Если использование ПВП окажется неэффективным, лаборатория должна убедиться, что дубильные вещества вина не взаимодействуют с ферментами.

4.2. Рабочие растворы

4.2.1. Буферный раствор активной кислотности 10,0 pH (0,60 M глицилглицина, 0,1 M L-глутаминовой кислоты). Подготовка может быть следующей:

- глицилглицин (4.1.2): 4,75 г,
- глутаминовая кислота (4.1.3): 0,88 г,
- ПВП (4.1.8): 1 г,
- вода для аналитических лабораторий (4.1.1): 50 мл.

Смесь доводят до pH 10 с использованием 10 M раствора гидроксида натрия, затем объем раствора доводят до 60 мл воды для лабораторного анализа. Раствор стабилен в течение 4-х недель при температуре 2-8 °C (приблизительно).

4.2.2. Рабочий раствор R1 (пример):

- вода для лабораторного анализа (4.1.1): 12 мл,
- НАД (4.1.4): 420 мг.

Этот раствор стабилен в течение 4-х недель при температуре 2-8 °C (приблизительно).

4.2.3. Рабочий раствор R2 (пример):

- вода для лабораторного анализа (4.1.1): 1,2 мл,
- L-МДН (4.1.5): 4800 Ед.,
- ГОТ (4.1.6): 320 Ед.

Этот раствор стабилен в течение 4-х недель при температуре 2-8 °C (приблизительно).

4.3. Калибровочные растворы

Для обеспечения максимально возможной связи с Международной системой единиц (СИ), калибровочный диапазон должен быть создан с использованием чистых растворов L-яблочной кислоты, приготовленных путем взвешивания и охвата диапазона измерений.

5. Аппаратура

5.1. Анализатор

5.1.1. Тип оборудования

Автоматический последовательный анализатор, оснащенный спектрофотометром с УФ-детектором. Температура реакции должна строго контролироваться (обычно 37°C).

Кюветы реакционные изготавливаются из стекла, метакрилата или кварца. Аппарат управляется программным обеспечением, обеспечивающим его работу и сбор данных для практических вычислений.

5.1.2. Показатель поглощения

Концентрация анализируемых веществ напрямую связана с разницей поглощения, измеряемой спектрофотометром. Точность считывания поглощения должна составлять как минимум 0,1 AU (единицы поглощения). Предпочтительно не использовать значения поглощения выше 2,0.

5.1.3. Точность отобранных объемов

Точность объемов реагентов и образцов, набираемых пипетками анализатора, влияет на результат измерения. Рекомендуется осуществлять контроль качества результатов с использованием соответствующих методик (например, в соответствии с руководствами, опубликованными МОВВ).

5.1.4. Продолжительность и температура реакции

Как правило, время реакции составляет 10 минут при температуре 37°C.
Для некоторых частей устройства могут применяться другие значения.

5.1.5. Использование холостого реактива

Результаты считываются путем сравнения интенсивности света, поглощенного на выбранной длине волны, между кюветой, в которой проводится реакция, и кюветой, в которой реакция не происходит (холостой контрольный реактив).

5.1.6. Длина волны

Длина волны максимального поглощения НАДН, образующегося в результате реакции, составляет 340 нм.

5.2. Баланс

Он должен быть откалиброван в соответствии с Международной системой единиц и иметь точность 1 мг.

5.3. Измеритель pH

5.4. Мерная посуда

Мерная стеклянная посуда для приготовления реактивов и калибровочных растворов относится к классу A.

6. Отбор проб

6.1. Подготовка образцов сусла и неигристых вин

В большинстве случаев образцы вина и сусла могут быть проанализированы без предварительной подготовки. Но в некоторых случаях некоторая подготовка может быть проведена:

- для образцов с высокой мутностью необходимо произвести фильтрацию или центрифугирование,
- для образцов со значениями, выходящими за пределы диапазона измерений, следует произвести разбавление пробы водой, предназначенной для лабораторных исследований (ручное или автоматическое).

6.2. Подготовка образцов игристого вина, содержащего CO2

Образцы игристого вина, содержащие CO2, могут давать эффект пузырьков. Они должны быть предварительно дегазированы путем перемешивания в вакууме, в процессе ультразвуковой обработки или любым другим способом, обеспечивающим требуемую дегазацию.

7. Проведение исследования

Учитывая, что могут использоваться различные анализаторы, рекомендуется строго соблюдать условия использования, предусмотренные производителем. Это также относится к различным ферментативным наборам, доступным на рынке.
Процедура происходит следующим образом:

1. Образец (S) помещают в кювету для реакций.
2. Затем в кювету добавляют рабочий раствор R1 (4.2.2).
3. Два вещества смешивают. Затем дается время на лаг-период, чтобы гарантировать стабильность абсорбции. Этот лаг-период может длиться от 1 до 5 минут и определяется лабораторией в зависимости от характеристик используемого оборудования.
4. Добавляется рабочий раствор R2 (4.2.3), и происходит реакция.

В качестве примера количество различных элементов может быть следующими:

- образец: 2,5 мкл,
- смесь 80% буфера (3.2.1) и 20% R1 (3.2.2): 120 мкл,
- R2 (3.2.3): 15 мкл.

Прибор производит регулярные измерения, которые позволяют получить кривую реакции, пример которой приведен на рисунке 1.

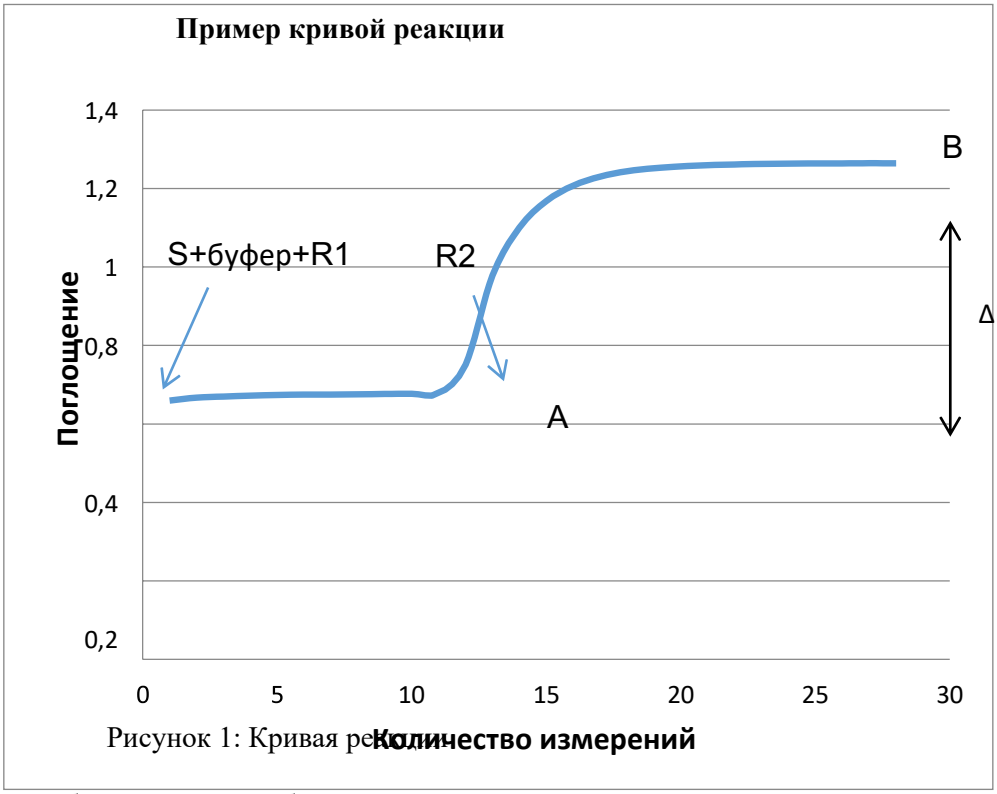


Рисунок 1: Кривая реакции

Прибор позволяет выбрать точки считывания для разницы в поглощении, например A и B на рисунке 1.

8. Расчет результатов

Измерение, используемое для определения результата, выглядит следующим образом:

$$\Delta\, DO = (\text{Поглощение } B - \text{Поглощение } A)$$

Чтобы соотнести значение ΔDO с желаемой концентрацией L-яблочной кислоты, проводится соответственная калибровка прибора с использованием калибровочных растворов (§4.3) как минимум в 3 точках, охватывающих диапазон измерений. В примере, приведенном на рисунке 2, полученная калибровочная кривая представляет собой прямую линию для значений от 0 до 2 г/л L-яблочной кислоты. В данном случае, для получения более высоких значений, предпочтительно разбавить пробу. Кроме того, используется холостой реагент, содержащий все реагенты, но без образца (точка 0 калибровки).

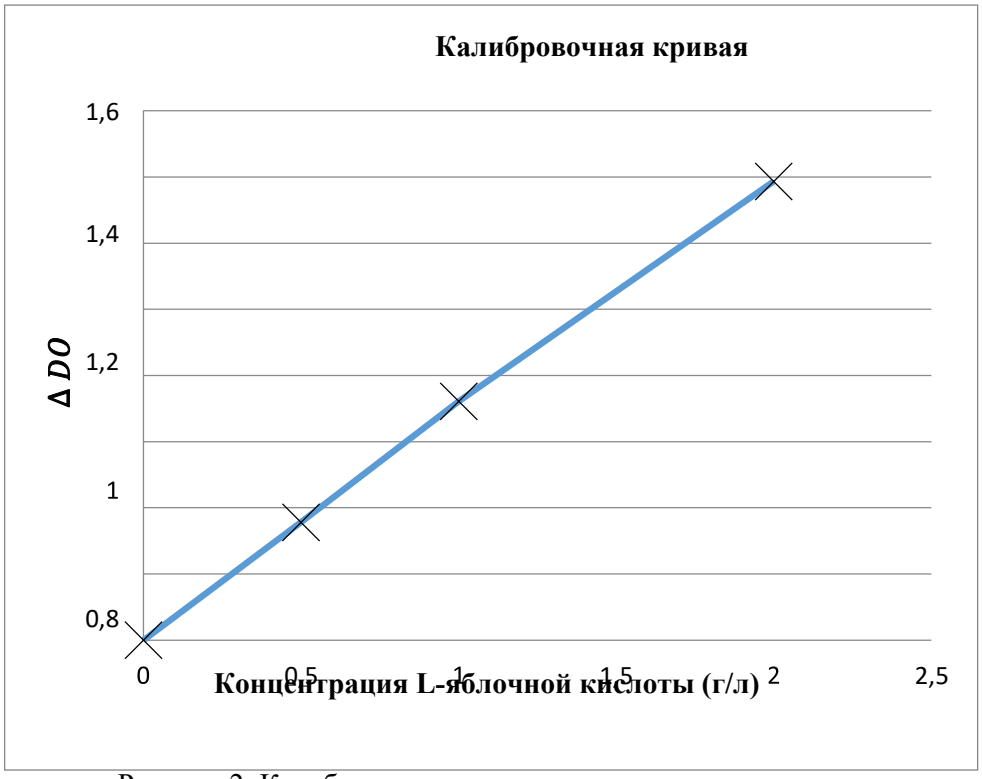


Рисунок 2: Калибровочная кривая

Калибровочная кривая может быть 1-го порядка (*Концентрация* = *a*.Δ*DO* + *b*) или 2-го порядка (*Концентрация* = *a*.Δ*DO* + *b*.Δ*DO* + *c*). При использовании калибровочной кривой 2-го порядка лабораториям следует позаботиться об ограничении области калибровки, чтобы сохранить достаточную чувствительность метода (существует риск искажения кривой при высоких концентрациях).

Полученное конечное значение следует умножить на некий используемый коэффициент разбавления.

9. Запись результатов

Результаты выражаются в г/л L-яблочной кислоты для 2-х точек разности.

10. Прецизионность

Межлабораторная воспроизводимость

RSD $_R$ = 5% (от 1 г/л)
CV $_R$% (k=2) = 2·RSD $_R$= 10%, (от 1 г/л)

Повторяемость

RSD $_r$ = 2% (от 1 г/л)
CV $_r$% (k=2) = 2·RSD$_r$ = 4% (от 1 г/л)

Предел количественной оценки

Подтвержденный LOQ = 0,12 г/л
(Концентрация, где CV R% (k=2) = 60%)

ПРИЛОЖЕНИЕ

Результаты межлабораторных испытаний

Совместное исследование

В общей сложности 16 лабораторий из разных стран приняли участие в совместном исследовании, организованном в 2016 году.

Лаборатория	Страна
Мигель Торрес С.А.- Усадьба Мас Ла Плана	ИСПАНИЯ
Экологический университет Кастилии и Леона	ИСПАНИЯ
INGACAL – Министерство сельского хозяйства и окружающей среды, станция виноградарства и энологии Галисии	ИСПАНИЯ
Винная станция Аро	ИСПАНИЯ
Комиссия по виноградарству региона дос Виньюс Вердес	ПОРТУГАЛИЯ
Лаборатории Дубернет	ФРАНЦИЯ
Лаборатория Динос Рона	ФРАНЦИЯ
Лаборатория Натоли	ФРАНЦИЯ
SCL- Лаборатория Монпелье	ФРАНЦИЯ
Сельскохозяйственный институт Словении	СЛОВЕНИЯ
Отделение: вино, мониторинг вина - химический анализ и ветеринарная экспертиза в Карлсруэ	ГЕРМАНИЯ
HBLAuBA - Высший федеральный колледж и Федеральное управление виноградарства и садоводства	АВСТРИЯ
Государственное следственное управление Майнца	ГЕРМАНИЯ
Высшая школа Гейзенхаймского университета - институт анализа вин и исследования напитков	ГЕРМАНИЯ
Подразделение химического виноделия и агропродовольственного комплекса - Технологический центр - Фонд Эдмунда Маха	ИТАЛИЯ
Ассоциация итальянских винных компаний	ИТАЛИЯ

Для анализа использовались 2 x 10 слепых дубликатов образцов с 1 повторением. Проанализированные вина произведены во Франции и Португалии, представляют сухие и ликерные вина.

Проба		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Позиция		1	9	2	13	3	4	5	15	6	10	16	20	7	11	12	17	8	19	14	18
Лаб 3	проб№1	1.12	1.09	2.16	2.21	**0.08**	**0.08**	1.38	1.39	**0.16**	**0.16**	*0.05*	*0.04*	0.07	0.06	1.31	1.35	**1.24**	**1.27**	0.07	0.07
	проб№2	1.15	1.11	2.18	2.11	**0.08**	**0.09**	1.35	1.41	**0.16**	**0.16**	*0.05*	*0.04*	0.06	0.06	1.32	1.30	**1.23**	**1.24**	0.07	0.07
Лаб 6	проб№1	0.99	0.95	2.28	2.31	**0.04**	**0.02**	1.44	1.47	**0.05**	**0.08**	*0.04*	*0.04*	0.06	0.04	1.38	1.46	1.34	1.19	**0.04**	**0.03**
	проб№2	0.93	0.93	2.15	2.16	**0.05**	**0.03**	1.23	1.37	**0.08**	**0.09**	*0.03*	*0.05*	0.03	0.04	1.28	1.30	1.20	1.28	**0.03**	**0.03**
Лаб 7	проб№1	1.10	1.10	2.28	2.33	0.01		1.44	1.52	0.12	0.10		*0.01*			1.38	1.41	1.33	1.30	0.01	0.02
	проб№2	1.13	1.13	2.35	2.33	0.03	0.04	1.47	1.49	0.14	0.13				0.02	1.40	1.43	1.32	1.33	0.02	0.03
Лаб 9	проб№1	1.14	1.10	2.27	2.21	0.06	0.10	1.43	1.48	0.19	0.19	*0.02*	*0.02*	0.05	0.06	1.35	1.38	1.27	1.28	0.05	0.08
	проб№2	1.15	1.20	2.20	2.23	0.10	0.06	1.50	1.51	0.15	0.14	*0.03*	*0.01*	0.09	0.11	1.31	1.37	1.22	1.28	0.04	0.06
Лаб 12	проб№1	1.12	1.12	2.34	2.32	**0.06**	**0.02**	1.47	1.54	0.14	0.14	*0.04*	*0.03*	0.03	0.03	1.37	1.37	1.29	1.31	0.06	0.04
	проб№2	1.12	1.12	2.38	2.34	**0.07**	**0.01**	1.46	1.46	0.16	0.19	*0.04*	*0.05*	0.03	0.04	1.32	1.33	1.28	1.30	0.06	0.04
Лаб 13	проб№1	1.11	1.09	2.12	2.26	0.04	0.02	1.44	1.45	**0.12**	**0.14**	*0.01*	*0.01*	0.03	0.03	1.45	1.33	1.29	1.29	0.02	0.02
	проб№2	1.18	1.17	2.20	2.29	0.03	0.01	1.47	1.50	**0.11**	**0.12**			0.02	0.03	1.39	1.38	1.32	1.33		0.01

Лаб 14	проб№1	1.32	1.30	2.66	2.68			1.69	1.67	0.08	0.08					1.65	1.60	1.51	1.52		
	проб№2	1.30	1.30	2.63	2.68			1.67	1.67	0.08	0.08					1.61	1.60	1.51	1.53		
Лаб 15	проб№1	**1.18**	**1.19**	2.29	2.42	0.06	0.05	1.41	1.50	0.16	0.16	*0.04*	*0.04*	0.08	0.08	1.33	1.39	1.26	1.30	0.07	0.07
	проб№2	**1.13**	**1.20**	2.21	2.42	0.05	0.05	1.49	1.52	0.16	0.16	*0.04*	*0.04*	0.08	0.08	1.38	1.39	1.27	1.28	0.07	0.07
Лаб 16	проб№1	**1.22**	**1.22**	2.52	2.48			1.63	1.62	0.09	0.09					**1.50**	**1.53**	1.47	1.45		
	проб№2	**1.21**	**1.20**	2.45	2.55			1.62	1.61	0.09	0.09		*0.03*			**1.52**	**1.51**	1.44	1.45		
Лаб 17	проб№1	1.14	1.14	2.22	2.22	0.07	0.08	1.51	1.50	0.17	0.17	*0.07*	*0.07*	0.11	0.11	1.34	1.35	1.28	1.27	0.09	0.09
	проб№2	1.13	1.15	2.17	2.20	0.08	0.08	1.46	1.47	0.18	0.17	*0.08*	*0.07*	0.12	0.12	1.31	1.34	1.28	1.29	0.09	0.09
Лаб 18	проб№1	1.10	1.11	2.14	2.13	0.18	0.18	1.42	1.52	0.28	0.28	***0.16***	***0.16***	0.19	0.19	1.33	1.38	1.27	1.31	0.17	0.18
	проб№2	1.10	1.13	2.19	2.16	0.18	0.18	1.44	1.51	0.27	0.27	***0.16***	***0.16***	0.19	0.19	1.33	1.38	1.29	1.33	0.17	0.18
Лаб 19	проб№1	1.13	1.19	2.20	2.23	0.08	0.08	1.47	1.44	0.17	0.19	***0.07***	***0.08***	0.11	0.11	1.36	1.30	1.27	1.26	0.10	0.10
	проб№2	1.15	1.22	2.21	2.23	0.08	0.09	1.48	1.45	0.18	0.19	***0.07***	***0.08***	0.12	0.11	1.33	1.30	1.28	1.24	0.09	0.10
Лаб 20	проб№1	1.17	1.20	2.27	2.27	0.04	0.05	1.50	1.48	0.17	0.17	*0.04*	*0.03*	0.07	0.07	1.33	1.34	1.28	1.29	0.07	0.06
	проб№2	1.17	1.20	2.27	2.27	0.04	0.05	1.50	1.48	0.17	0.17	*0.04*	*0.03*	0.07	0.07	1.34	1.34	1.28	1.29	0.07	0.06
Лаб 21	проб№1	1.10	1.12	2.30	2.47	0.05	0.05	1.45	1.49	0.11	0.10	*0.05*	*0.05*	0.05	0.05	1.46	1.44	1.33	1.41	0.05	0.05
	проб№2	1.09	1.16	2.28	2.50	0.05	0.05	1.49	1.51	0.09	0.11	*0.05*	*0.05*	0.05	0.05	1.43	1.46	1.34	1.37	0.05	0.05
Лаб 22	проб№1	1.08	1.07	2.35	2.31	0.04	0.03	1.46	1.45	0.11	0.12	*0.01*	*0.02*	0.03	0.03	1.35	1.35	**1.26**	**1.31**	**0.03**	**0.02**
	проб№2	1.06	1.08	2.30	2.31	0.04	0.04	1.51	1.46	0.12	0.12	*0.01*	*0.03*	0.04	0.03	1.35	1.34	**1.28**	**1.25**	**0.01**	**0.01**

Таблица полученных данных. Значения, выделенные жирным шрифтом, соответствуют значениям, отклоненным в соответствии с тестом Кохрана (отклонения от дисперсии) с уровнем значимости 2,5% (односторонний тест) и тестом Граббса (отклонения от среднего значения) с уровнями значимости 2,5% (двусторонний тест).

Примечание: Отсутствующие значения не были предоставлены соответствующей лабораторией.

Проба	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Количество выбранных лабораторий	15	15	12	14	13	13	12	12	12	12
Количество повторений	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Минимум	0.95	2.15	0.03	1.38	0.08	0.01	0.02	1.32	1.25	0.02
Максимум	1.31	2.66	0.08	1.68	0.28	0.08	0.19	1.45	1.36	0.10
Общее среднее значение	1.14	2.30	0.05	1.49	0.14	0.04	0.07	1.36	1.29	0.05
Стандартное отклонение повторяемости	0.001	0.003	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
Межлабораторное среднеквадратическое отклонение	0.08	0.14	0.02	0.07	0.05	0.02	0.05	0.04	0.03	0.03
Стандартное отклонение воспроизводимости	0.006	0.021	0.001	0.006	0.003	0.000	0.002	0.002	0.001	0.001
Среднеквадратическое отклонение повторяемости	0.03	0.05	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.01
Предел повторяемости r	0.07	0.15	0.04	0.08	0.02	0.02	0.01	0.07	0.06	0.02
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSDr	2.2%	2.4%	25.0%	2.0%	6.2%	15.4%	7.4%	1.9%	1.6%	14.5%

Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости	0.08	0.14	0.02	0.08	0.05	0.02	0.05	0.04	0.04	0.03
Предел воспроизводимости R	0.22	0.41	0.07	0.21	0.16	0.06	0.14	0.12	0.10	0.08
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSDR	6.9%	6.2%	46.9%	5.0%	39.1%	57.5%	71.2%	3.2%	2.8%	53.1%
Величина Horwitz для повторяемости RSDr	3.66	3.29	5.81	3.51	5.02	6.13	5.57	3.56	3.59	5.81
Индекс повторяемости Horwitz r	0.61	0.72	4.30	0.57	1.24	2.52	1.33	0.53	0.45	2.49
Величина Horwitz для воспроизводимости RSDR	5.55	4.99	8.80	5.32	7.60	9.29	8.44	5.40	5.44	8.81
Индекс воспроизводимости Horwitz R	1.25	1.25	5.33	0.95	5.14	6.19	8.43	0.59	0.51	6.02

Таблица полученных результатов

Примечание: Результаты проб C, F, G и J следует принимать с осторожностью из-за очень низких уровней концентрации, которые ниже установленного лабораториями предела количественной оценки.

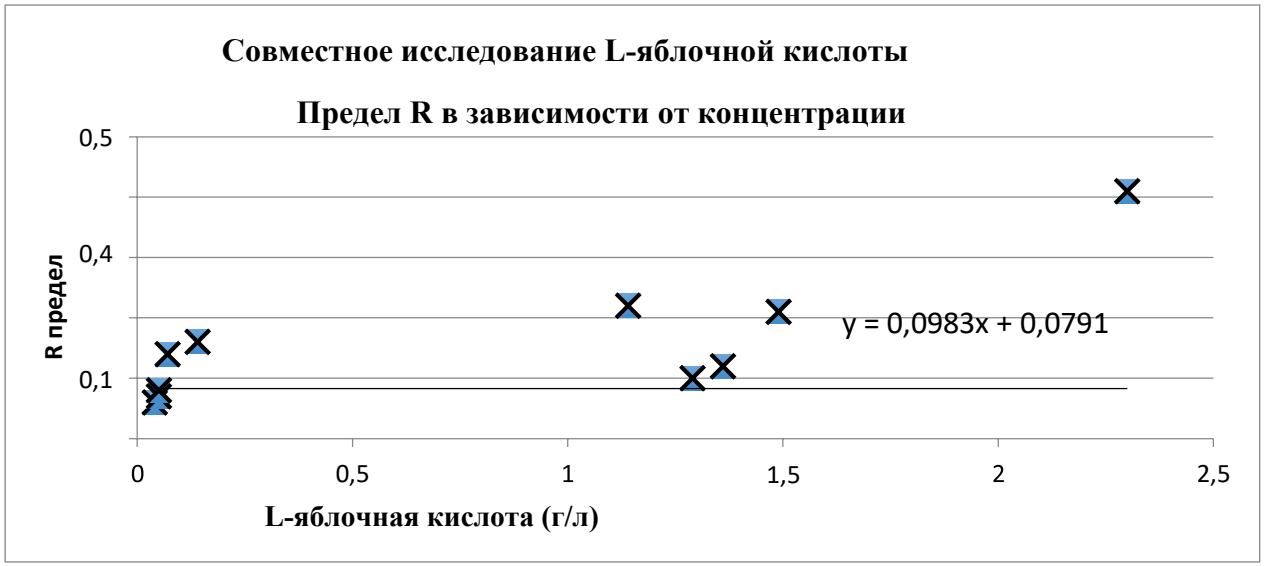


Рисунок 3: Предел R в зависимости от концентрации

Совместное исследование L-яблочной кислоты

Межлабораторная воспроизводимость RSD $_R$% в зависимости от концентрации

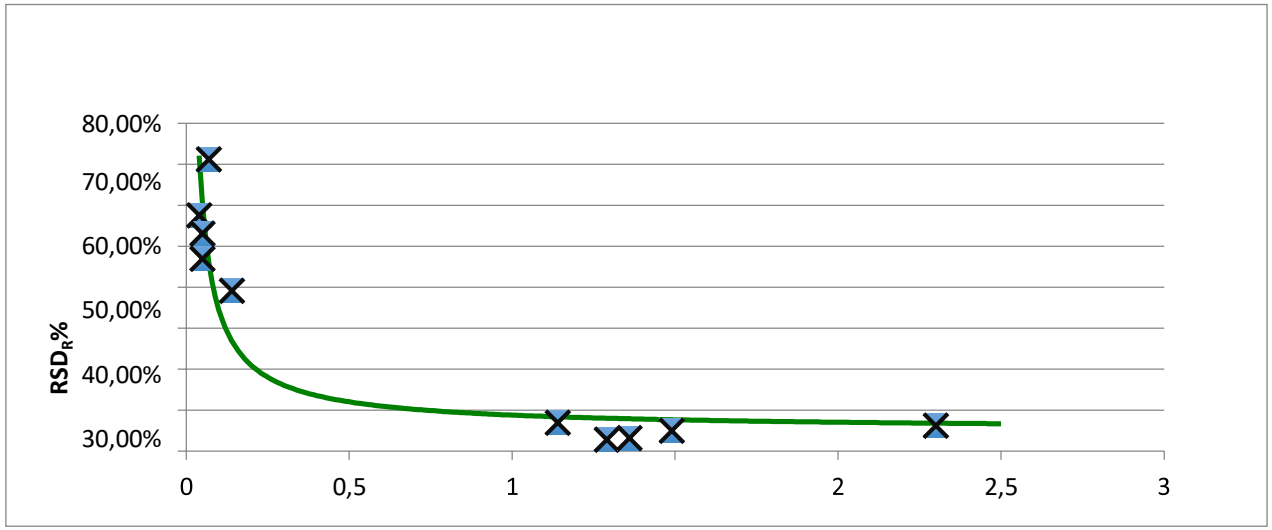


Рисунок 4: RSD $_R$% в соответствии с концентрацией
Моделирование: **$CV\% = 3{,}763 \cdot C^{(-0{,}895)} + 5$**

Метод OIV-MA-AS313-27 Метод II типа

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В ВИНАХ АВТОМАТИЗИРОВАННЫМ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ МЕТОДОМ

OIV-OENO 621-2019

1. *Область применения*

Данный способ позволяет определить уксусную кислоту в вине с использованием метода специфического ферментативного анализа и автоматического последовательного анализатора. Предел измерений уксусной кислоты, который был объектом текущей межлабораторной проверки, составляет от 0,2 до 1,14 г/л.

ПРИМЕЧАНИЕ: Пределы более высоких значений могут быть проанализированы при разбавлении образца.

2. *Нормативные ссылки*

- ISO 78-2: Химия – Макеты стандартов

3. *Сущность реакции*

В присутствии АТФ уксусная кислота превращается в ацетилфосфат в реакции, катализируемой ацетаткиназой.

(1) Ацетат + АТФ—Ацетаткиназа→ Ацетилфосфат + АДФ

АДФ, образующийся в результате этой реакции, повторно превращается в АТФ в реакции с фосфоенолпируватом, катализируемой пируваткиназой.

(2) АДФ + Фосфоенолпируват—Пируваткиназа→Пируват + АТФ

Пируват восстанавливается до L-лактата восстановленным никотинамидадениндинуклеотидом (НАДН), катализируемым лактатдегидрогеназой.

(3) Пируват + НАДН + H^+ —Лактатдегидрогеназа→ Лактат + $НАД^+$ + H2O

Количество окисленного НАДН в реакции (3) определяется путем измерения поглощения при 340 нм и пропорционально концентрации уксусной кислоты в вине.

Примечание 1:

Когда ферментативный анализ проводится вручную, считывание выполняется после достижения стабилизированного конечного плато. Для достижения этой цели четвертая реакция позволяет полностью сдвинуть равновесие реакции 1 в сторону образования ацетилфосфата путем удаления последнего.

(4) Ацетилфосфат + CoA — фосфотрансацетилаза→ Ацетил -CoA + Неорганический фосфат

В случае анализа автоматизированным методом, который имеет более короткое время анализа, нет необходимости достигать стабилизированного конечного плато, и эта реакция бессмысленна. Поэтому использование фосфотрансацетилазы не является необходимым и не описывается.

Примечание 2:

В цепочке ферментативных реакций участвует пируват. Низкие количества пирувата (несколько десятков мг/л), обычно присутствующие в винах, не оказывают существенного влияния на результат. За редкими случаями присутствие в вине нетипичного количества пирувата может привести к искажению метода.

4. Реагенты и рабочие растворы

Во время анализа – если нет указаний – используют только качественные и надежные лабораторные реагенты, дистиллированную или деминерализованную воду, или воду эквивалентной чистоты.

4.1. Реагенты

4.1.1. Вода I или II степени чистоты для лабораторных анализов (стандарт ISO 3696)

4.1.2. 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS): CAS № 1132-61- 2

4.1.3. Гексагидрат хлорида магния: CAS № 7791-18-6

4.1.4. Хлорид калия: CAS № 7447-40-7

4.1.5. β-никотинамидадениндинуклеотид (НАДН): CAS № 53-84-9, чистота ≥ 98%

4.1.6. Аденозин-5'-трифосфат, динатриевая соль (АТФ): CAS № 56-65-5

4.1.7. Гидроксид калия: CAS № 1310-58-3

4.1.8. Соль фосфоенолпирувата три (циклогексиламмония): CAS № 35556-70-8 или фосфоенолпируват натрия: CAS№138-08-9 (PEP)

4.1.9. Ацетаткиназа (АК): CAS № 9027-42-3

4.1.10. Пируваткиназа (РК): CAS № 9001-59-6

4.1.11. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ): CAS № 9001-60-9

4.1.12. Поливинилпирролидон (ПВП): CAS № 9003-39-8

4.1.13. Уксусная кислота: чистота ≥ 99,5%; CAS № 64-19-7

4.1.14. Хлорид натрия: CAS № 7647-14-15

4.1.15. Бычий сывороточный альбумин (BSA): CAS № 9048-46-8

Примечание 3: Существуют коммерческие наборы для определения уксусной кислоты. Пользователь должен проверить состав, чтобы убедиться, что набор содержит вышеуказанные реагенты. Такие наборы иногда поставляются с фосфотрансацетилазой (избыточной при использовании автоматизированного метода).

Примечание 4: Рекомендуется использовать ПВП для устранения любого возможного негативного действия дубильных веществ в вине на молекулы ферментативного белка. В том случае, если применение ПВП неэффективно, отсутствие воздействия дубильных веществ вина на ферменты лаборатория должна обеспечить самостоятельно.

Примечание 5: BSA - реагент, используемый для стабилизации ферментов в растворе.

4.2. Рабочие растворы

4.2.1. Буфер MOPS

Препарат может быть следующим:

- 13 г MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота) (4.1.2),
- 0,5 г гексагидрата хлорида магния (4.1.3),
- 1,5 г хлорида калия (KCl) (4.1.4),
- 1,3 г ПВП (4.1.12),
- 250 мл воды для аналитического использования (4.1.1).

Доводят pH до 4,75 с помощью 1,5 М раствора гидроксида калия (KOH) (4.1.7).

Оставляют на 5 минут и доводят pH до 7,45 с помощью 1,5 М раствора гидроксида калия (KOH) (4.1.7).

Доводят объём раствора до 300 мл водой для лабораторных анализов (4.1.1).

Буфер может храниться не менее 60 дней при температуре 2-8°C (приблизительно).

4.2.2. Рабочий раствор 1 (R1)

Препарат может быть следующим:

- 100 мл буфера MOPS (4.2.1),
- 300-350 мг аденозин-5'-трифосфата, динатриевой соли (АТФ) (4.1.6),
- 50 мг фосфоенолпируват (ФЕП) три(циклогексиламмоний) соль (4.1.8),
- 40 мг β-никотинамидадениндинуклеотида (восстановленная форма) (НАДН) (4.1.5).

Рабочий раствор R1 можно хранить не менее 30 дней при температуре 2-8°C (приблизительно).

4.2.3. Рабочий раствор 2 (R2)

Препарат может быть следующим:

- 100 мл буфера MOPS (4.2.1),
- прибл. 40 единиц пируваткиназы (ПК) (4.1.10),

- прибл. 40 единиц лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (4.1.11),
- 50 единиц ацетаткиназы (АК) (4.1.9),
- 300 мг BSA (4.1.15).

Рабочий раствор R2 можно выдерживать примерно 48 часов при температуре 2-8°C (приблизительно).

Примечание: В процессе приготовления раствор осторожно перемешивают (во избежание образования пены). Лаборатории должны учитывать факт, что жизненный цикл рабочих растворов ограничен и соблюдать эти требования.

4.3. Калибровочные растворы

Чтобы обеспечить максимально возможную связь с Международной системой единиц (СИ), диапазон калибровки должен состоять из чистых растворов уксусной кислоты (4.1.13). Рекомендуется приготовить исходный раствор (например, 1,5 г/л$^{-1}$ уксусной кислоты) по весу, затем остальные калибровки получают из исходного раствора, чтобы охватить диапазон измерений.

"Нулевое" значение может быть получено с использованием раствора

хлорида натрия 9‰ (4.1.14) или эквивалентного физиологического раствора.

5. Аппаратура

5.1. Анализатор

5.1.1. Тип оборудования

Автоматический последовательный анализатор, оснащенный спектрофотометром с УФ-детектором. Температура реакции должна поддерживаться одинаковой (около 37 °C). Кюветы реакционные изготавливаются из стекла, метакрилата или кварца. Оборудование управляется программным обеспечением, обеспечивающим его работу и сбор данных для практических вычислений.

5.1.2. Показатель поглощения

Концентрация аналитиков напрямую связана с разницей поглощения, измеряемой спектрофотометром. Точность считывания поглощения

должна составлять как минимум 0,1 AU (единицы поглощения). Значения абсорбции не должно достигать максимального для используемого спектрометра.

5.1.3. Презиционность отобранных проб

Объемы реагентов и проб, набираемые пипетками анализатора, должны быть достаточно точными, чтобы не создавать искажение в результатах измерения.

5.1.4. Продолжительность и температура реакции

Как правило, время реакции составляет 10 минут при температуре 37°C. Но для некоторых частей устройства другие значения могут применяться.

5.1.5. Использование холостого реактива

Результаты считываются путем сравнения интенсивности света, поглощенного на выбранной длине волны, между кюветой, в которой проводится реакция, и кюветой, в которой реакция не происходит (холостой контрольный реактив).

5.1.6. Длина волны

Длина волны максимального поглощения НАДН, образующегося в результате реакции, составляет 340 нм. Данную длину волны принято выбирать для спектрофотометров. Вторая длина волны берется для корректировки возможного матричного эффекта и составляет 410 нм. Измерения проводятся на основе разницы поглощений DO340 - DO410.

5.2. Равновесие

Прибор должен быть откалиброванo в соответствии с Международной системой единиц и иметь разрешение 1 мг.

5.3. Измеритель pH

5.4. Мерная посуда

Мерная стеклянная посуда для приготовления реактивов и калибровочных растворов относится к классу A.

6. Подготовка проб

6.1. Отбор проб

6.1.1. Подготовка образцов неигристых вин

В большинстве случаев образцы вин могут быть проанализированы без предварительной подготовки. Но в некоторых случаях подготовка может быть проведена:

- для проб с высокой мутностью необходимо произвести фильтрацию. Пробы со значениями, выходящими за пределы диапазона измерений, следует разбавить водой для лабораторных исследований (ручное или автоматическое).

6.1.2. Подготовка образцов игристого вина

Образцы игристого вина должны быть предварительно дегазированы перемешиванием в вакууме, ультразвуковой обработкой или любым другим способом, обеспечивающим требуемую дегазацию.

7. Проведение исследования

Учитывая то, что различные анализаторы могут использоваться, рекомендуется строго соблюдать условия пользования, предусмотренные производителем. Это также относится к различным ферментативным наборам, доступным на рынке.
Порядок выполнения следующий:

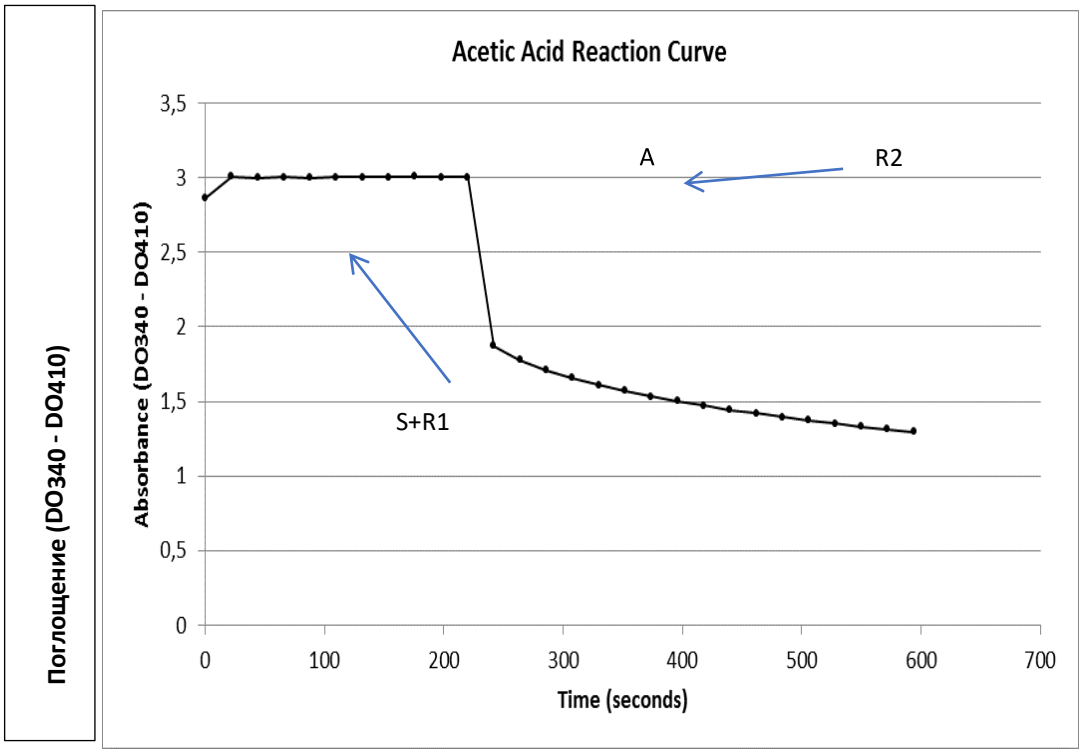
1. Образец (S) помещают в кювету для реакций.
2. Затем в кювету добавляют рабочий раствор R1 (4.2.2).
3. Проходит гомогенизация. Дают время на лаг-период, который обеспечивает стабильность поглощения. Лаг-период может длиться от 1 до 5 минут и определяется лабораторией в зависимости от характеристик используемого оборудования.
4. Далее добавляют рабочий раствор R2 (4.2.3) и вызывают реакцию.

В качестве примера приводится сочетание различных элементов:

- образец: 3 мкл,
- R1: 120 мкл, при T0 (начало секвенции),
- R2: 60 мкл, при T0 + 3 мин 40 сек.

Так как устройство позволяет производить регулярные измерения, предоставляется возможным получить кривую реакции, пример которой приведен на рисунке 1.

Кривая реакции уксусной кислоты



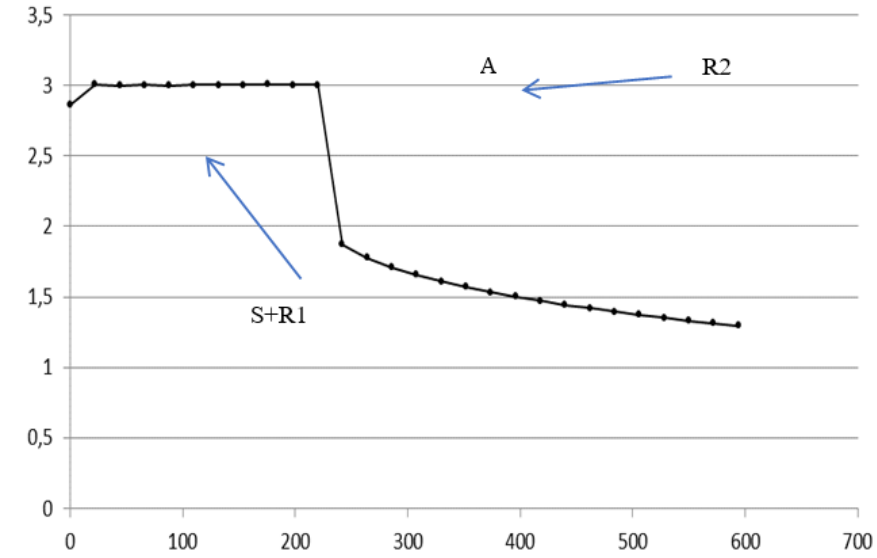


Рисунок 1. Кривая реакции

Оборудование позволяет выбрать точки считывания искомой разницы в поглощении, например, A и B на рисунке 1.

Для того чтобы соотнести эти значения с концентрацией уксусной кислоты, постоянно проводится калибровка прибора с использованием калибровочных растворов как минимум в 3-х точках, в пределах указанного предела измерений. Несмотря на то, что полученная калибровочная кривая близка к прямой линии, используется уравнение второй степени. Пример приведен на рисунке 2.

Кроме того, используется холостой реактив, состоящий из всех реактивов, но без образца (точка 0 калибровки).

Калибровочная кривая уксусной кислоты

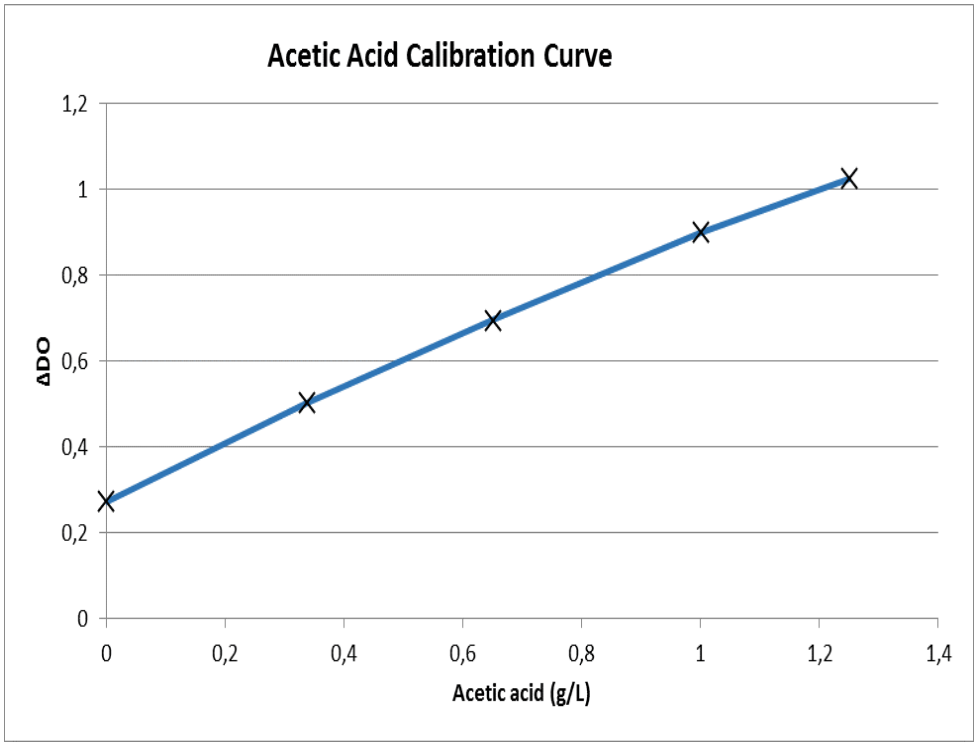


Рисунок 2. Калибровочная кривая

8. Расчеты

Для каждого измерения результат выдается в соответствии со следующей формулой: R = / Поглощение B - Поглощение A/

Полученные таким образом данные наносятся на калибровочную кривую для получения значений концентрации уксусной кислоты. Полученное окончательное значение следует умножить на некоторый используемый коэффициент разбавления.

9. Выражение результатов

Результаты выражаются в г/л уксусной кислоты с точностью до двух десятых или же в других используемых единицах измерений (мэкв/л).

Выражение результата должно находиться в пределах погрешности измерения.

10. Показатели автоматизированного ферментативного метода

Межлабораторная воспроизводимость

RSD_R = 10%

CV_R% (k=2) = 2·RSD_R= 20%

Воспроизводимость

RSD_r = 4%

CV_r% (k=2) = 2·RSD_r = 8%

Пределы численных значений

Обозначен предельный уровень < 0.2 г/л

Не определен в совместном исследовании

11. Библиография

- McCLOSKEY Leo P., ‘An Improved enzymatic assay for acetate in juice and wine’, *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 31, No. *2*1980.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Изучение эффективности метода

Совместное исследование

В совместном исследовании приняли участие 11 лабораторий из 5 разных стран.

Лаборатория	Страна
Мигель Торрес С.А.- Усадьба Мас Ла Плана	ИСПАНИЯ
INGACAL – Министерство сельского хозяйства и окружающей среды, станция виноградарства и энологии Галисии	ИСПАНИЯ
Винная станция Аро	ИСПАНИЯ
Лаборатории Дубернет	ФРАНЦИЯ
Лаборатория Динос Рона	ФРАНЦИЯ
Лаборатория Натоли	ФРАНЦИЯ
SCL- Лаборатория Монпелье	ФРАНЦИЯ
Отделение: вино, мониторинг вина - химический анализ и ветеринарная экспертиза в Карлсруэ	ГЕРМАНИЯ
HBLAuBA - Высший федеральный колледж и Федеральное управление виноградарства и садоводства	АВСТРИЯ
Высшая школа Гейзенхаймского университета - институт анализа вин и исследования напитков	ГЕРМАНИЯ
Ассоциация итальянских винных компаний	ИТАЛИЯ

Таблица 1. Участвующие лаборатории

Всего было проанализировано 2 x 10 образцов, подготовленных как слепые дубликаты, с 1 повторением. Анализировались сухие, подслащенные и ликерные вина, происхождением из Франции и Португалии.

Проба		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		Портвейн		Подслащенное вино		Сухое вино		Сухое вино		Sweetened wine		Сухое вино		Сухое вино		Подслащенное вино		Подслащенное вино		Подслащенное вино	
Позиция		1	9	2	13	3	4	5	15	6	10	16	20	7	11	12	17	8	19	14	18
Лаб 3	проб№1	0.24	0.27	0.20	0.21	0.65	0.65	0.47	0.49	0.54	0.52	*1.28*	*1.30*	0.64	0.63	0.29	0.31	0.39	0.37	0.63	0.62
	проб №2	0.25	0.26	0.20	0.21	0.67	0.65	0.46	0.50	0.56	0.53	*1.29*	*1.33*	0.65	0.67	0.29	0.28	0.36	0.37	0.65	0.61
Лаб 7	проб№1	0.20	0.20	0.22	0.23	0.62	0.62	0.45	0.46	0.50	0.50	*1.25*	*1.30*	0.61	0.62	0.28	0.28	0.34	0.35	0.62	0.60
	проб №2	0.20	0.21	0.21	0.22	0.63	0.64	0.45	0.46	0.53	0.52	*1.20*	*1.20*	0.61	0.64	0.29	0.28	0.35	0.37	0.60	0.61
Лаб 9	Проб№1	0.17	0.18	0.18	0.19	0.57	0.52	0.40	0.40	0.41	0.43	*1.18*	*1.18*	0.57	0.54	0.24	0.29	0.36	0.32	0.53	0.51
	проб №2	0.17	0.19	0.16	0.17	0.59	0.57	0.39	0.43	0.44	0.41	*1.16*	*1.14*	0.55	0.55	0.25	0.29	0.30	0.33	0.55	0.51
Лаб 12	проб№1	0.17	0.18	0.20	0.20	0.56	0.53	0.40	0.41	0.44	0.44	*1.02*	*1.01*	0.53	0.53	0.27	0.28	0.36	0.33	0.49	0.51
	проб №2	0.17	0.18	0.20	0.21	0.55	0.54	0.40	0.41	0.44	0.44	*1.02*	*1.01*	0.52	0.52	0.28	0.29	0.36	0.34	0.48	0.51
Лаб 13	проб№1	0.22	0.19	0.23	0.20	0.50	0.51	0.40	0.40	0.42	0.44	*0.95*	*0.97*	0.48	0.49	0.27	0.28	0.32	0.32	0.48	0.50
	проб №2	0.20	0.19	0.23	0.21	0.52	0.52	0.39	0.39	0.43	0.42	*0.97*	*0.96*	0.51	0.48	0.28	0.28	0.32	0.33	0.50	0.51
Лаб 14	проб№1	0.17	0.17	0.20	0.19	0.56	0.57	0.42	0.41	0.46	0.45	*1.10*	*1.14*	0.55	0.54	0.27	0.26	0.34	0.32	0.53	0.51
	проб №2	0.17	0.17	0.20	0.19	0.56	0.57	0.42	0.41	0.45	0.44	*1.12*	*1.10*	0.53	0.55	0.26	0.26	0.33	0.31	0.53	0.53
Лаб 15	проб№1	0.22	0.23	0.28	0.27	0.68	0.68	0.52	0.52	0.56	0.56	*1.20*	*1.23*	0.69	0.73	0.35	0.34	**0.47**	**0.42**	0.60	0.62
	проб №2	0.22	0.22	0.26	0.26	0.68	0.63	0.53	0.50	0.52	0.54	*1.18*	*1.13*	0.65	0.67	0.34	0.34	**0.42**	**0.41**	0.59	0.64
Лаб 17	проб№1	0.20	0.19	0.26	0.25	0.54	0.52	0.41	0.42	0.39	0.39	*1.01*	*1.00*	**0.49**	**0.45**	0.32	0.29	0.34	0.35	**0.44**	**0.43**
	проб №2	0.20	0.20	0.27	0.27	0.53	0.55	0.43	0.43	0.43	0.43	*1.03*	*1.05*	**0.49**	**0.49**	0.31	0.32	0.37	0.38	**0.44**	**0.46**
Лаб 18	проб№1	0.27	0.25	**0.35**	**0.33**	0.69	0.68	**0.53**	**0.56**	**0.59**	**0.59**	*1.24*	*1.21*	0.66	0.68	**0.43**	**0.41**	**0.50**	**0.51**	**0.65**	**0.63**
	проб №2	0.28	0.27	**0.36**	**0.36**	0.68	0.69	**0.55**	**0.57**	**0.60**	**0.60**	*1.26*	*1.23*	0.68	0.71	**0.44**	**0.43**	**0.50**	**0.52**	**0.63**	**0.65**

Лаб 20	проб№1	0.23	0.20	0.29	0.29	0.58	0.57	0.49	0.47	0.47	0.47	*1.15*	*1.13*	0.55	0.58	0.34	0.35	0.39	0.40	0.55	0.52
	проб №2	0.23	0.20	0.29	0.29	0.58	0.57	0.49	0.47	0.47	0.47	*1.15*	*1.13*	0.55	0.58	0.34	0.36	0.39	0.40	0.55	0.52
Лаб 22	проб№1	0.17	0.16	0.20	0.18	0.60	0.60	0.43	0.44	0.47	0.47	*1.20*	*1.20*	0.58	0.58	0.26	0.26	0.32	0.32	0.55	0.58
	проб №2	0.17	0.17	0.19	0.19	0.61	0.61	0.43	0.43	0.48	0.47	*1.21*	*1.22*	0.59	0.58	0.26	0.27	0.31	0.33	0.54	0.59

Таблица 2. Таблица полученных данных (в г/л$^{-1}$ уксусной кислоты).

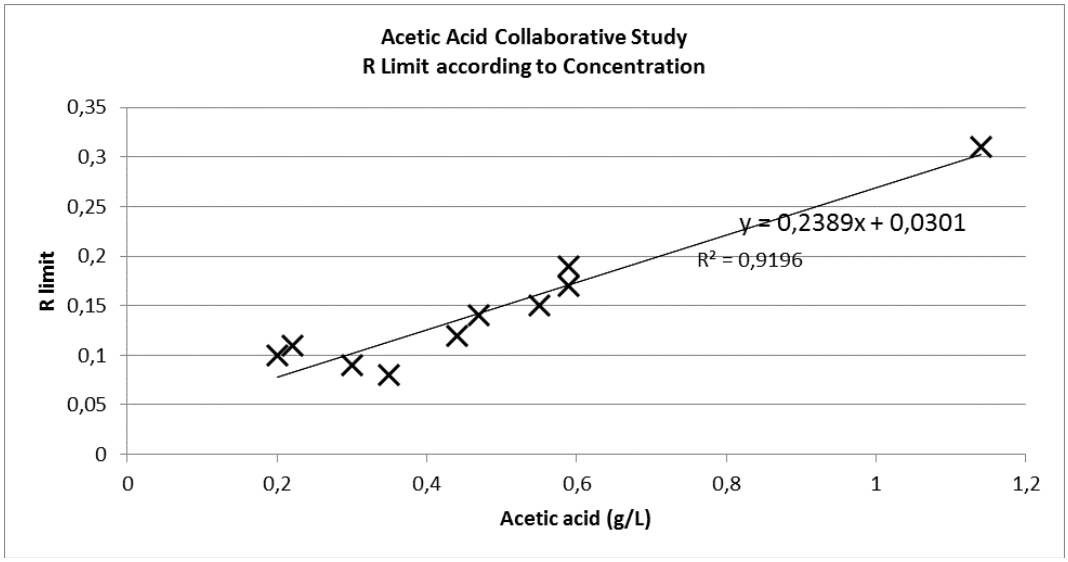
Значения, выделенные жирным шрифтом, соответствуют значениям, отклонённым тестом Кохрана (разброс дисперсии) с уровнем значимости 2,5% (односторонний) и тестом Граббса (отклонения от среднего) с уровнем значимости 2,5% (двусторонний).

Проба	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Количество выбранных лабораторий	11	10	11	10	10	11	10	9	9	9
Количество повторений	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Минимум	0.17	0.18	0.51	0.40	0.41	0.96	0.49	0.26	0.32	0.50
Максимум	0.27	0.29	0.69	0.52	0.55	1.30	0.69	0.35	0.39	0.63
Общее среднее значение	0.20	0.22	0.59	0.44	0.47	1.14	0.59	0.30	0.35	0.55
Стандартное отклонение повторяемости	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0002	0.0006	0.0003	0.0001	0.0003	0.0003
Межлабораторное среднеквадратическое отклонение	0.03	0.04	0.06	0.04	0.05	0.11	0.07	0.03	0.03	0.05
Стандартное отклонение воспроизводимости	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002	0.012	0.005	0.001	0.001	0.003
Среднеквадратическое отклонение повторяемости	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02
Предел повторяемости r	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.07	0.05	0.02	0.05	0.05
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSDr	4.5%	4.5%	2.4%	2.7%	2.9%	2.1%	3.1%	2.8%	4.8%	3.2%
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости	0.03	0.04	0.06	0.04	0.05	0.11	0.07	0.03	0.03	0.05
Предел воспроизводимости R	0.10	0.11	0.17	0.12	0.14	0.31	0.19	0.09	0.08	0.15
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSDR	16.8%	17.4%	9.9%	9.5%	10.6%	9.5%	11.7%	11.1%	8.5%	9.5%
Величина Horwitz для повторяемости RSDr	4.74	4.68	4.04	4.22	4.18	3.66	4.04	4.49	4.38	4.08

Индекс повторяемости Horwitz r	0.96	0.97	0.60	0.63	0.70	0.58	0.77	0.62	1.10	0.79
Величина Horwitz для воспроизводимости RSDR	7.18	7.09	6.12	6.40	6.34	5.54	6.13	6.80	6.63	6.18
Индекс воспроизводимости Horwitz R	2.34	2.45	1.63	1.49	1.67	1.71	1.91	1.63	1.29	1.53

Таблица 3. Таблица полученных результатов

Совместное исследование по уксусной кислоте



Предел R

Уксусная кислота (г/л)

Рисунок 3. Предел R в зависимости от концентрации

Метод OIV-MA-AS313-28 Метод II типа

Определение содержания D-глюконовой кислоты в винах и суслах с помощью автоматизированного ферментативного метода

OIV-OENO 622-2019

1. *Область применения*

Данный метод позволяет определить D-глюконовую кислоту в винах и суслах методом специального ферментативного анализа при помощи автоматического последовательного анализатора для концентраций аналита от 0,06 г/л до 5,28 г/л (с учетом разбавления пробы).

2. *Сущность метода*

D-глюконат, присутствующий в пробе, фосфорилируемыйаденозинтрифосфатом (АТФ) в ходе ферментативной реакции, катализируемой глюконаткиназой (ГК), с образованием D-глюконат 6-фосфата и аденозиндифосфата (АДФ).

$$\text{D-глюконат} + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{ГК}} \text{D-глюконат-6-Р} + \text{АДФ}$$

В присутствии никотинамид аденин динуклеотид фосфата (НАДФ) D-глюконат-6-фосфат окисляется с образованием рибулозы-5-фосфата под действием фермента 6-фосфоглюконат дегидрогеназы (6-PGDH). Количество образующегося восстановленного никотинамид аденин динуклеотид фосфата в Н форме (НАДФН) соответствует количеству D-глюконат-6-фосфата и, соответственно, D-глюконовой кислоты.

$$\text{D-глюконат-6-Р} + \text{НАДФ+} \xrightarrow{\text{6-PGDH}} \text{Рибулоза-5-Ф} + \text{НАДФН} + \text{CO2} + \text{H}^{+}$$

Восстановленный никотинамид аденин динуклеотид фосфат

(НАДФН) определяется спектрофотометрически при длине волны максимального поглощения НАДФН в 340 нм. Концентрация НАДФН пропорциональна концентрации D-глюконовой кислоты.

3. *Реагенты и рабочие растворы*

3.1. Реагенты:

3.1.1. Дистиллированная вода для лабораторного использования, сертифицированная по стандарту EN ISO 3696

3.1.2. PIPES (пиперазин-1,4-бис [этансульфоновая кислота]) (CAS № 5625-37-6)

3.1.3. β - NADP -Na2 (β -Никотинамидадениндинуклеотидфосфат, динатриевая соль) (CAS № 24292-60-2)

3.1.4. MgCl2-6H2O (магния хлорид гексагидрат) (CAS № 7791-18-6)

3.1.5. ATP-Na2 (Аденозин 5'-трифосфат динатриевая соль) (CAS № 987-65-5)

3.1.6. Глюконат-киназа (ГК) (EC 2.7.1.12)

3.1.7. 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGDH) (EC 1.1.1.44)

3.1.8. Натриевая соль D-глюконовой кислоты (CAS № 527-07-1), минимальная чистота 99%

3.1.9. NaOH (гидроксид натрия) (CAS № 1310-73-2)

3.1.10. PVP K-90 (Поливинилпирролидон K-90) (CAS № 9003-39-8)

3.2. Рабочие растворы

3.2.1. Реагент 1: растворяют 30,2 г PIPES (3.1.2) (100 ммоль/л), 1 г β-NADP-Na2 (3.1.3) (1,3 ммоль/л), 5,28 г NaOH (3.1.9) и 5 г PVP K-90 (3.1.10) в 1 л дистиллированной воды (3.1.1). pH должен быть в пределах 6,3-6,4. Раствор стабилен в течение 4 недель при температуре 2-8 °C.

3.2.2. Реагент 2: растворяют 30,2 г PIPES (3.1.2) (100 ммоль/л), 1 г $MgCl_2$-$6H_2O$ (3.1.4) (1,3 ммоль/л), 4,84 г ATP-Na_2 (3.1.5) и 7,6 г NaOH (3.1.9) в 1 л дистиллированной воды (3.1.1). pH должен быть в пределах 7,0-7,2. Добавляют 10 KU глутонат киназы (3.1.6) и 10 KU 6-фосфоглюконат дегидрогеназы (3.1.7). Этот раствор стабилен в течение 4 недель при температуре 2-8 °C.

3.3. Калибровочные растворы

Калибровочные растворы готовятся из натриевой соли D-глюконовой кислоты (3.1.8) путем взвешивания и в концентрациях, покрывающих линейный диапазон метода (0,06-2 г/л).

Примечание 1: Описанные выше составы рассчитаны на приготовления 1 л реагента. Другие объемы изготавливаются в соответствии с потребностями лаборатории.

Примечание 2: Имеются коммерческие наборы для определения D-глюконовой кислоты. Пользователь должен убедиться, что в набор входят все указанные выше реагенты.

4. ***Аппаратура***

4.1. Последовательный автоматический анализатор с контролем температуры (приблизительно 37 °C), настроенный на измерение абсорбции при 340 нм. Аппарат должен иметь программное обеспечение, облегчающее сбор данных и выполняющее необходимые расчеты.

4.2. Спектрофотометр или фотометр для измерения абсорбции при 340 нм.

4.3. Стеклянные, кварцевые или метакрилатные кюветы.

4.4. Стеклянная посуда класса А для регулярного использования в лаборатории (колбы, пипетки и т.д.)

4.5. Микропипетки

4.6. Аналитические весы с разрешением ± 0,0001 г.

4.7. Измеритель pH.

5. ***Подготовка проб***

В случае необходимости выполняют процедуру подготовки пробы:

5.1. Фильтруют или центрифугируют пробы, если они содержат взвешенные частицы.

5.2. Дегазируют пробы, содержащие углекислый газ, путем перемешивания под вакуумом, в ультразвуковой ванне или любым другим способом, позволяющим достичь требуемого уровня дегазации.

5.3. Пробы с концентрацией вне установленного предела линейной зависимости (2 г/л), разбавляют дистиллированной водой (3.1.1). Полученную концентрацию следует умножить на коэффициент разбавления.

6. *Проведение исследования*

Принимая во внимание факт, что могут использоваться различные типы анализаторов, рекомендуется строго следовать инструкции производителя.
То же относится к готовым ферментативным наборам коммерческого производства.

Ниже подробно описаны процедуры (объемы приведены в качестве примера).

6.1. Процедура ручным методом
6.1.1.Подогревают реагенты и фотометр до 37 °C.
6.1.2.Добавляют в кювету с помощью пипетки следующие вещества:

	Контрольный реактив (RB)	Стандартный раствор/ проба
Стандартный раствор /проба	-	33 мкл
Дистиллированная вода	33мкл	-
Реагент 1	800 мкл	6 мкл

6.1.3. Перемешивают и выдерживают 1 мин при температуре 37 °C. Подсчитывают абсорбцию (A1) при 340 нм.

6.1.4. Добавляют в кювету с помощью пипетки следующие вещества:

Реагент 2	200 мкл	200 мкл

6.1.1. Перемешивают и оставляют на 10 мин при 37 °C. Подсчитывают

абсорбцию (A2) холостого реагента, стандарта и пробы при 340 нм.

6.2. Автоматический анализ

6.2.1 Вносят указанные параметры в автоматический анализатор (соответствует требованиям, изложенным в пункте 4.1):

Длина волны: 340 нм

Температура: 37 °C

Режим анализа: 2 точки (дифференциал)

Объем пробы: 10 мкл

Объем реагента 1: 240 мкл

Объем реагента 2: 60 мкл

6.2.2 Программируют приложение анализатора таким образом, чтобы оно выполняло следующую последовательность действий:

	Контрольный реактив (RB)	Стандартный раствор/ проба
Стандартный раствор / проба	-	10 мкл
Дистиллированная вода	10 мкл	-
Реагент 1	240мкл	240 мкл

Перемешивают, оставляют на 1-5 минут и подсчитывают абсорбцию (A1).

Затем добавляют:

Реагент 2	60 мкл	60 мкл

Перемешивают, выдерживают10 минут и подсчитывают абсорбцию (A2).
Так как аппарат производит регулярные замеры, получить кинетику реакции

не предоставляется сложным (рис. 1).

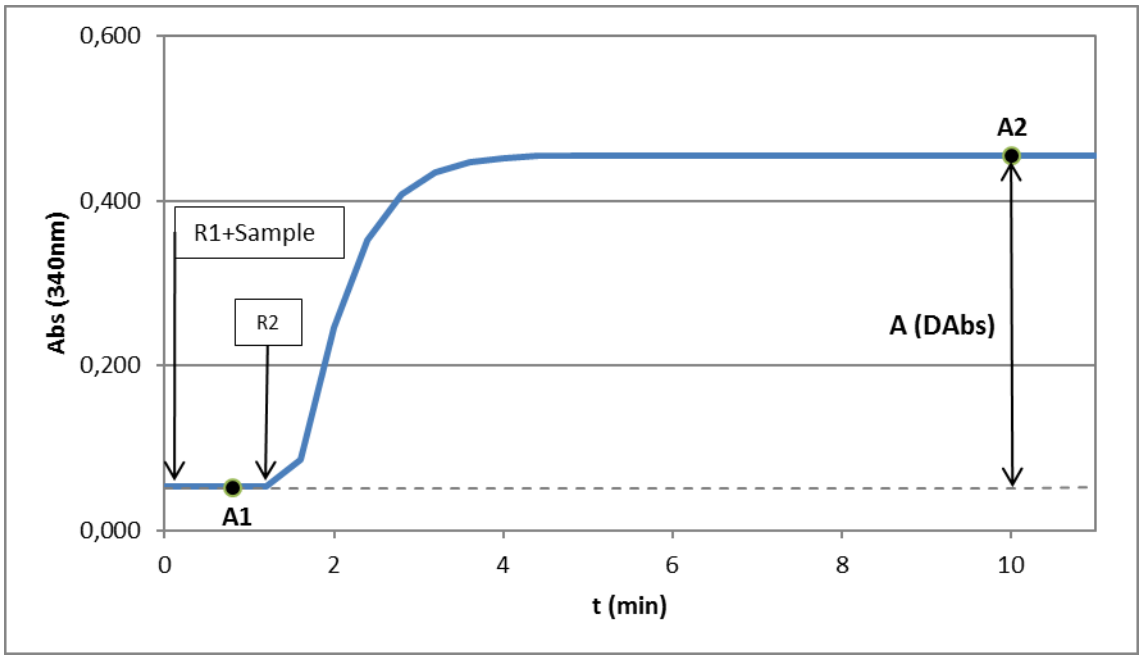


Рисунок 1: Пример кинетики реакции

6.2.3. Рекомендуется проверить калибровку, выполнив три рандомных контрольных замера в обозначенной области измерений. Каждая лаборатория устанавливает свою внутреннюю программу контроля качества, а также процедуры коррекции на случай несоответствия результатов контроля предельно допустимым нормам.

7. *Расчеты*

Рассчитывают концентрацию D-глюконовой кислоты по следующей формуле:

- Если калибровка проводится в одной точке (стандартный раствор) и контрольный реактив:

$$\frac{(A2 - 0.81 \times A1)\text{Проба} - (A2 - 0.81 \times A1)}{(A2 - 0.81 \times A1)\text{Стандарт} - (A2 - 0.81 \times A1)\text{RB}} \times F \times \text{г/л Стандарт} = \text{г/л Проба}$$

- Если калибровка выполняется с помощью калибровочной линии:

$$A = (A2 - 0.81 \times A1)\text{ Проба} - (A2 - 0.81 \times A1)\text{RB}$$

Для получения концентрации D-глюконовой кислоты рассчитанная абсорбция (A) интерполируется на калибровочную линию (рис. 2).

Полученная концентрация умножается на коэффициент разбавления (F).

A1: абсорбция холостой пробы/стандарта/пробы + реагент 1

A2: абсорбция холостой пробы/стандарта/пробы + реагент 1 + реагент 2

RB: контрольный реактив

0,81: коэффициент коррекции разбавления реагента 1 (может варьироваться в зависимости от используемых объемов в соответствии с формулой [объем пробы + Реагент 1] / [объем пробы + реагент 1 + реагент 2]).

F: коэффициент разбавления пробы (применяется в случае необходимости)

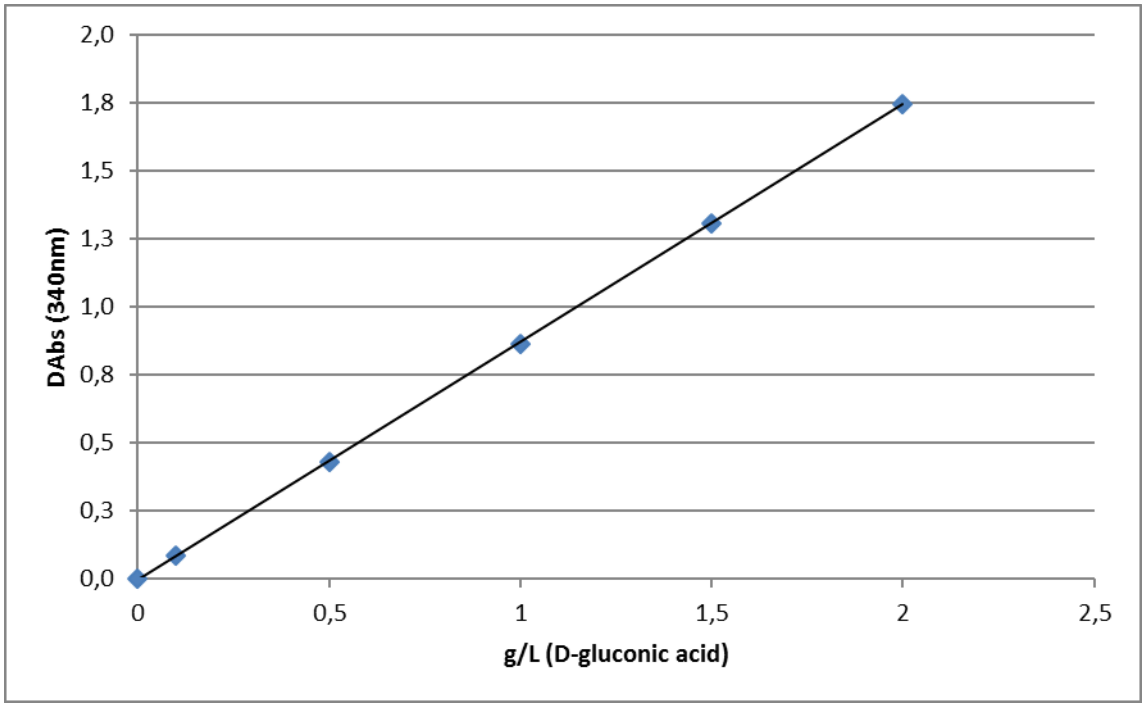


Рисунок 2: Пример калибровочной линии

8. Выражение результатов

Результаты выражаются в г/л с точностью до 2 знаков после запятой и с учетом погрешности

9. Основные показатели автоматизированного ферментативного метода

9.1. Повторяемость

$r = 0.0396x + 0.0098$

При этом **x** представляет собой концентрацию глюконовой кислоты в г/л.

9.2 Воспроизводимость
$R = 0.1226x + 0.0237$

При этом **x** представляет собой концентрацию глюконовой кислоты в г/л.

9.3 Предел количественного определения
Обозначен предельный уровень LoQ = 0.06 г/л.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Результаты межлабораторных испытаний

1. Совместное исследование

1.1. Лаборатории-участники: 19 лабораторий приняли участие из 6 разных стран.

Лаборатория	Страна
Агроскоп	Швейцария
Компания « Biosystems S.A.»	Испания
Федеральное управление виноградарства	Австрия
Федеральный институт оценки рисков (BfR)	Германия
Центролаб 2006, S.L	Испания
Межпрофессиональный комитет вин Шампани (CIVC)	Франция
Станция виноградарства и энологии Наварры (EVENA)	Испания
Станция виноградарства и энологии Алькасар-де-Сан-Хуан	Испания
Винная станция Кастилии и Леона (ITACyL)	Испания
Винная станция Аро	Испания
Federal College and Research Institute for Viticulture and Pomology (HBLA)	Австрия
"Фрейшинет С.А." ведущий производитель игристого вина	Испания
Каталонский институт винограда и вина (INCAVI)	Испания
Институт вин Дору и Порту (IVDP)	Португалия
Лаборатории Диэноса Рона	Франция

Лаборатории Дюберне	Франция
Агропродовольственная Арбитражная Лаборатория	Испания
Государственное следственное управление, Институт пищевой химии и тестирования лекарственных средств	Германия
Мигель Торрес, СА	Испания

Для анализа использовались 2 x 10 слепых дубликатов проб с 1 повторением.

1.2. Образцы

Проба	ёмкость	тип пробы
A	1 / 12	Мускат
B	2 / 11	Концентрированное сусло
C	3 / 13	Сульфитированное сусло
D	4 / 15	Белое вино
E	5 / 14	Белое вино
F	6 / 16	Розовое вино
G	7 / 10	Красное вино
H	8 / 19	Красное вино
I	9 / 18	Красное вино

	J	17 / 20	Специально приготовленный матричный раствор

1.3. Результаты автоматизированного метода

		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		1	12	2	11	3	13	4	15	5	14	6	16	7	10	8	19	9	18	17	20
1	Проб №1	2.10	2.00	1.00	1.00	0.23	0.23	0.29	0.28	0.10	0.11	2.72	2.72	5.20	5.25	0.15	0.15	0.49	0.48	0.06	0.06
	Проб №2	2.01	2.02	0.99	1.00	0.22	0.23	0.30	0.29	0.11	0.10	2.70	2.68	5.13	5.18	0.14	0.14	0.48	0.49	0.05	0.06
	(1)	**2.06**	**2.01**	**1.00**	**1.00**	**0.23**	**0.23**	**0.30**	**0.29**	**0.11**	**0.11**	**2.71**	**2.70**	**5.17**	**5.22**	**0.15**	**0.15**	**0.49**	**0.49**	**0.06**	**0.06**
	Проб №1	1.95	2.02	1.02	0.99	0.23	0.23	0.29	0.30	0.10	0.09	2.79	2.72	5.27	5.24	0.13	0.13	0.47	0.46	0.05	0.05
2	Проб №2	2.00	2.10	1.03	1.01	0.23	0.23	0.29	0.30	0.11	0.10	2.75	2.80	5.30	5.20	0.13	0.13	0.47	0.45	0.05	0.05
	(2)	**1.97**	**2.06**	**1.03**	**1.00**	**0.23**	**0.23**	**0.29**	**0.30**	**0.11**	**0.10**	**2.77**	**2.76**	**5.28**	**5.22**	**0.13**	**0.13**	**0.47**	**0.45**	**0.05**	**0.05**
	Проб №1	2.19	2.19	1.06	1.07	0.27	0.28	0.34	0.33	*0.13*	*0.13*	2.95	3.06	5.54	5.63	0.08	0.08	0.51	0.50	0.06	0.06
3	Проб №2	2.21	2.30	1.09	1.07	0.27	0.28	0.34	0.34	*0.13*	*0.13*	2.95	2.99	5.51	5.68	0.07	0.08	0.49	0.50	0.06	0.06
	(3)	**2.20**	**2.24**	**1.07**	**1.07**	**0.27**	**0.28**	**0.34**	**0.34**	***0.13***	***0.13***	**2.95**	**3.02**	**5.53**	**5.66**	**0.07**	**0.08**	**0.50**	**0.50**	**0.06**	**0.06**
	Проб №1	2.10	2.10	1.02	1.05	0.23	0.24	0.28	0.29	0.10	0.10	2.70	2.80	*3.78*	*3.94*	0.13	0.12	0.45	0.46	*0.10*	*0.10*
4	Проб №2	2.08	2.12	1.03	1.04	0.24	0.25	0.29	0.29	0.10	0.11	2.72	2.82	*3.80*	*3.98*	0.13	0.13	0.45	0.45	*0.10*	*0.10*
	(4)	**2.09**	**2.11**	**1.03**	**1.05**	**0.24**	**0.25**	**0.29**	**0.29**	**0.10**	**0.11**	**2.71**	**2.81**	***3.79***	***3.96***	**0.13**	**0.13**	**0.45**	**0.46**	***0.10***	***0.10***
	Проб №1	1.88	1.94	0.98	0.96	*0.22*	*0.33*	0.27	0.26	0.10	0.09	2.68	2.58	4.95	4.90	0.11	0.08	0.43	0.42	0.04	0.05
5	Проб №2	2.06	2.12	0.99	1.00	*0.24*	*0.23*	0.29	0.29	0.11	0.09	3.08	2.84	5.40	5.30	0.12	0.15	0.47	0.48	0.07	0.06
	(5)	**1.97**	**2.03**	**0.99**	**0.98**	***0.23***	***0.28***	**0.28**	**0.28**	**0.11**	**0.09**	**2.88**	**2.71**	**5.18**	**5.10**	**0.12**	**0.12**	**0.45**	**0.45**	**0.06**	**0.06**
	Проб №1	2.06	2.02	1.00	1.01	0.22	0.23	0.28	0.29	0.10	0.10	2.80	2.78	5.22	5.22	0.12	0.12	0.46	0.46	0.05	0.05
6	Проб №2	1.98	2.01	0.99	1.00	0.22	0.22	0.27	0.28	0.09	0.10	2.75	2.75	5.22	5.22	0.12	0.11	0.45	0.46	0.05	0.05
	(6)	**2.02**	**2.02**	**0.99**	**1.00**	**0.22**	**0.23**	**0.28**	**0.29**	**0.09**	**0.10**	**2.78**	**2.77**	**5.22**	**5.22**	**0.12**	**0.12**	**0.45**	**0.46**	**0.05**	**0.05**
	Проб №1	2.02	2.02	0.98	0.99	0.23	0.23	0.29	0.29	0.11	0.11	2.74	2.75	5.28	5.16	0.13	0.13	0.46	0.47	0.05	0.06
7	Проб	2.01	2.01	0.98	0.99	0.23	0.23	0.30	0.29	0.11	0.12	2.75	2.74	5.28	5.22	0.14	0.14	0.46	0.47	0.05	0.05

	№2																				
	(7)	**2.02**	**2.02**	**0.98**	**0.99**	**0.23**	**0.23**	**0.30**	**0.29**	**0.11**	**0.12**	**2.75**	**2.75**	**5.28**	**5.19**	**0.14**	**0.14**	**0.46**	**0.47**	**0.05**	**0.06**
	Проб №1	2.09	2.11	1.02	1.01	0.24	0.24	0.29	0.29	0.10	0.09	2.83	2.84	5.20	5.25	0.10	0.10	0.47	0.46	0.05	0.05
8	Проб №2	2.10	2.09	1.00	1.01	0.24	0.23	0.29	0.29	0.10	0.10	2.80	2.78	5.18	5.18	0.10	0.08	0.47	0.47	0.05	0.05
	(8)	**2.10**	**2.10**	**1.01**	**1.01**	**0.24**	**0.24**	**0.29**	**0.29**	**0.10**	**0.10**	**2.82**	**2.81**	**5.19**	**5.22**	**0.10**	**0.09**	**0.47**	**0.47**	**0.05**	**0.05**
	Проб №1	1.94	2.02	1.00	1.00	0.24	0.24	0.29	0.29	0.11	0.11	2.74	2.74	5.15	5.25	0.15	0.15	0.47	0.48	0.06	0.06
9	Проб №2	1.94	2.00	1.00	1.00	0.24	0.24	0.29	0.29	0.11	0.11	2.76	2.74	5.10	5.10	0.14	0.15	0.47	0.47	0.06	0.06
	(9)	**1.94**	**2.01**	**1.00**	**1.00**	**0.24**	**0.24**	**0.29**	**0.29**	**0.11**	**0.11**	**2.75**	**2.74**	**5.13**	**5.18**	**0.15**	**0.15**	**0.47**	**0.48**	**0.06**	**0.06**
	Проб №1	1.95	2.05	1.00	1.00	0.23	0.23	0.29	0.29	0.11	0.10	2.70	2.65	5.20	5.30	0.14	0.14	0.48	0.45	0.05	0.05
10	Проб №2	2.00	2.00	0.99	1.00	0.23	0.25	0.28	0.29	0.10	0.11	2.70	2.75	5.40	5.30	0.13	0.13	0.48	0.46	0.05	0.05
	(10)	**1.98**	**2.03**	**1.00**	**1.00**	**0.23**	**0.24**	**0.29**	**0.29**	**0.11**	**0.11**	**2.70**	**2.70**	**5.30**	**5.30**	**0.14**	**0.14**	**0.48**	**0.46**	**0.05**	**0.05**
	Проб №1	*0.10*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	0.23	0.25	0.29	0.33	0.08	0.10	*0.13*	*0.26*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	0.06	0.05
11	Проб №2	*0.10*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	0.25	0.24	0.28	0.27	0.08	0.10	*0.13*	*0.26*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	*<0.05*	0.05	0.05
	(11)	***0.10***	**-**	**-**	**-**	**0.24**	**0.25**	**0.29**	**0.30**	**0.08**	**0.10**	***0.13***	***0.26***	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**0.06**	**0.05**
	Проб №1	*2.49*	*2.47*	*1.17*	*1.16*	0.29	0.27	*0.38*	*0.38*	*0.14*	*0.13*	*3.51*	*3.42*	*6.37*	*6.12*	0.18	0.18	*0.61*	*0.60*	0.06	0.05
12	Проб №2	*2.56*	*2.53*	*1.16*	*1.20*	0.30	0.28	*0.38*	*0.37*	*0.14*	*0.13*	*3.43*	*3.32*	*6.28*	*6.24*	0.18	0.18	*0.61*	*0.60*	0.06	0.05
	(12)	***2.53***	***2.50***	***1.17***	***1.18***	**0.30**	**0.28**	***0.38***	***0.38***	***0.14***	***0.13***	***3.47***	***3.37***	***6.33***	***6.18***	**0.18**	**0.18**	***0.61***	***0.60***	**0.06**	**0.05**
	13a	2.05	2.06	0.98	0.98	0.22	0.22	0.28	0.27	0.10	0.10	2.76	2.74	5.27	5.18	0.13	0.15	0.46	0.45	0.05	0.05
13	13b	2.05	2.06	0.98	0.98	0.22	0.22	0.28	0.27	0.10	0.10	2.76	2.74	5.27	5.18	0.13	0.15	0.46	0.45	0.05	0.05
	(13)	**2.05**	**2.06**	**0.98**	**0.98**	**0.22**	**0.22**	**0.28**	**0.27**	**0.10**	**0.10**	**2.76**	**2.74**	**5.27**	**5.18**	**0.13**	**0.15**	**0.46**	**0.45**	**0.05**	**0.05**
	Проб №1	1.86	1.86	0.96	0.96	0.23	0.24	*0.29*	*0.32*	0.11	0.10	2.57	2.64	4.99	5.19	*0.17*	*0.11*	*0.50*	*0.39*	0.05	0.09
14	Проб №2	1.88	1.86	0.95	0.97	0.23	0.23	*0.29*	*0.32*	0.15	0.1	2.56	2.65	5.00	5.10	*0.15*	*0.11*	*0.45*	*0.34*	0.06	0.05
	(14)	**1.87**	**1.86**	**0.96**	**0.97**	**0.23**	**0.24**	***0.29***	***0.32***	**0.13**	**0.10**	**2.57**	**2.65**	**5.00**	**5.15**	***0.16***	***0.11***	***0.48***	***0.37***	**0.06**	**0.07**
	Проб №1	1.91	1.98	1.11	1.12	0.30	0.31	0.32	0.33	0.10	0.11	3.23	3.13	5.88	6.01	*0.13*	*0.16*	0.50	0.52	*0.02*	*0.04*
15	Проб №2	1.93	1.99	1.12	1.13	0.31	0.32	0.32	0.34	0.09	0.12	3.24	3.14	5.90	6.08	*0.12*	*0.17*	0.51	0.53	*0.02*	*0.04*

	(15)	**1.92**	**1.99**	**1.12**	**1.13**	**0.31**	**0.32**	**0.32**	**0.34**	**0.10**	**0.12**	**3.24**	**3.14**	**5.89**	**6.05**	***0.13***	***0.17***	**0.51**	**0.53**	***0.02***	***0.04***
	Проб №1	1.98	1.99	1.00	1.00	0.23	0.23	0.28	0.28	0.10	0.10	2.78	2.82	5.27	5.34	0.13	0.13	0.47	0.47	0.05	0.05
16	Проб №2	2.04	2.08	0.99	1.00	0.23	0.23	0.28	0.28	0.10	0.10	2.79	2.81	5.30	5.28	0.14	0.14	0.47	0.47	0.05	0.05
	(16)	**2.01**	**2.04**	**1.00**	**1.00**	**0.23**	**0.23**	**0.28**	**0.28**	**0.10**	**0.10**	**2.79**	**2.82**	**5.29**	**5.31**	**0.14**	**0.14**	**0.47**	**0.47**	**0.05**	**0.05**
	Rep №1	2.27	2.22	*1.17*	*1.20*	0.27	0.27	0.30	0.29	0.12	0.10	2.75	2.72	5.20	4.95	0.16	0.17	0.46	0.47	0.07	0.07
17	Rep №2	2.24	2.21	*1.19*	*1.19*	0.29	0.29	0.29	0.28	0.12	0.11	2.77	2.79	5.05	4.90	0.16	0.12	0.46	0.42	0.08	0.06
	(17)	**2.26**	**2.22**	***1.18***	***1.20***	**0.28**	**0.28**	**0.30**	**0.29**	**0.12**	**0.11**	**2.76**	**2.76**	**5.13**	**4.93**	**0.16**	**0.15**	**0.46**	**0.45**	**0.08**	**0.07**
	Проб №1	2.08	2.08	1.02	1.00	0.24	0.23	0.29	0.28	0.11	0.10	2.80	2.82	5.40	5.37	0.14	0.15	0.48	0.49	0.06	0.05
19	Проб №2	2.08	2.08	1.01	1.00	0.23	0.24	0.28	0.29	0.10	0.11	2.82	2.80	5.28	5.40	0.14	0.14	0.47	0.47	0.05	0.05
	(19)	**2.08**	**2.08**	**1.02**	**1.00**	**0.24**	**0.24**	**0.29**	**0.29**	**0.11**	**0.11**	**2.81**	**2.81**	**5.34**	**5.39**	**0.14**	**0.15**	**0.48**	**0.48**	**0.06**	**0.05**

Таблица полученных данных. Значения, выделенные курсивом, соответствуют результатам, удаленным из-за выбросов отдельных значений согласно критериям обычного 2-стороннего теста Граббса (2-сторонний, P = 2,5%), а также в соответствии с тестом Кохрана (1-сторонний тест, где P = 2,5%).

Проба	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Допущенные лаборатории	16	15	17	16	16	16	15	15	15	16
Количество повторений	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Минимальное значение	1.87	0.96	0.22	0.28	0.09	2.61	5.03	0.07	0.45	0.05
Максимальное значение	2.24	1.12	0.31	0.34	0.12	2.81	5.97	0.18	0.52	0.07
Среднее значение (г/л)	**2.04**	**1.01**	**0.25**	**0.29**	**0.10**	**2.79**	**5.28**	**0.13**	**0.47**	**0.06**
среднее квадратичное отклонение повторяемости r	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.08	0.01	0.01	0.01
Предел повторяемости r limit = 2 2* Sr	0.09	0.02	0.02	0.02	0.03	0.13	0.22	0.02	0.02	0.02
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSDr	1.48%	0.76 %	2.13%	1.93%	8.53%	1.70%	1.50%	3.99%	1.70%	9.86%
Среднее квадратичное отклонение воспроизводимости (SR)	0.09	0.04	0.03	0.02	0.01	0.13	0.24	0.03	0.02	0.01
Предел воспроизводимости R limit = 2 2* SR	0.28	0.11	0.07	0.05	0.06	0.38	0.67	0.07	0.05	0.02
Относительное стандартное отклонение	4.63%	3.96 %	10.57%	5.89%	8.91%	4.81%	4.50%	19.21%	4.09%	12.49%

воспроизводимости RSDR										
Величина Horwitz повторяемости RSDr (%)	3.39%	3.77 %	4.66%	4.54%	5.31%	3.23%	2.94%	5.12%	4.22%	5.84%
Индекс воспроизводимости Horwitz r	0.44	0.20	0.46	0.43	1.61	0.53	0.51	0.78	0.40	1.69
Величина Horwitz воспроизводимости RSDR (%)	5.08%	5.65 %	6.99%	6.81%	7.96%	4.85%	4.40%	7.68%	6.34%	8.75%
Индекс воспроизводимости Horwitz R	0.91	0.70	1.51	0.86	1.12	0.99	1.02	2.50	0.65	1.43

S: среднее квадратичное отклонение / RSD: Относительное стандартное отклонение /
r: Предел повторяемости / R: Предел воспроизводимости

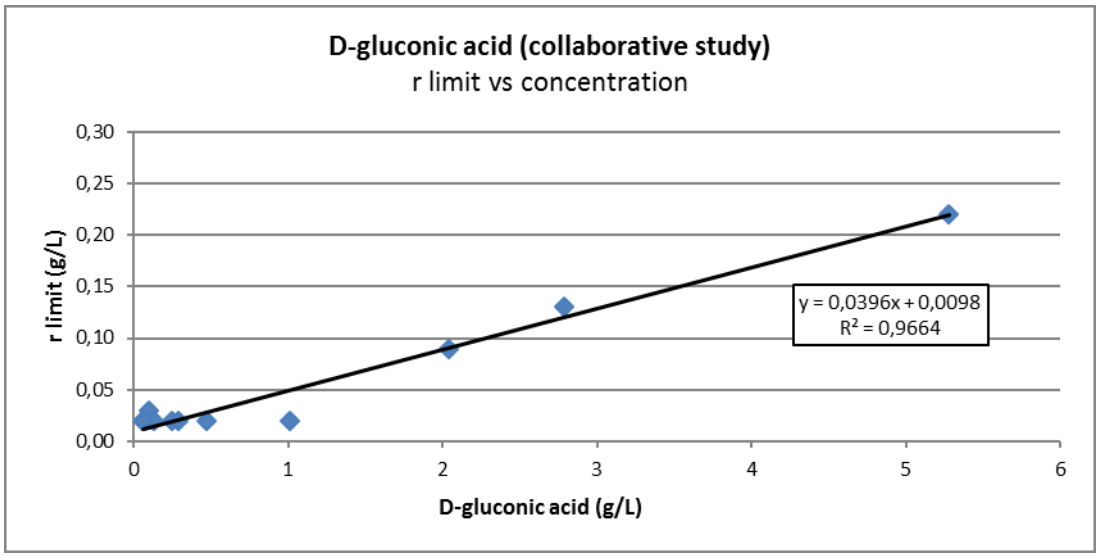


Рисунок 3: Зависимость предела повторяемости от концентрации

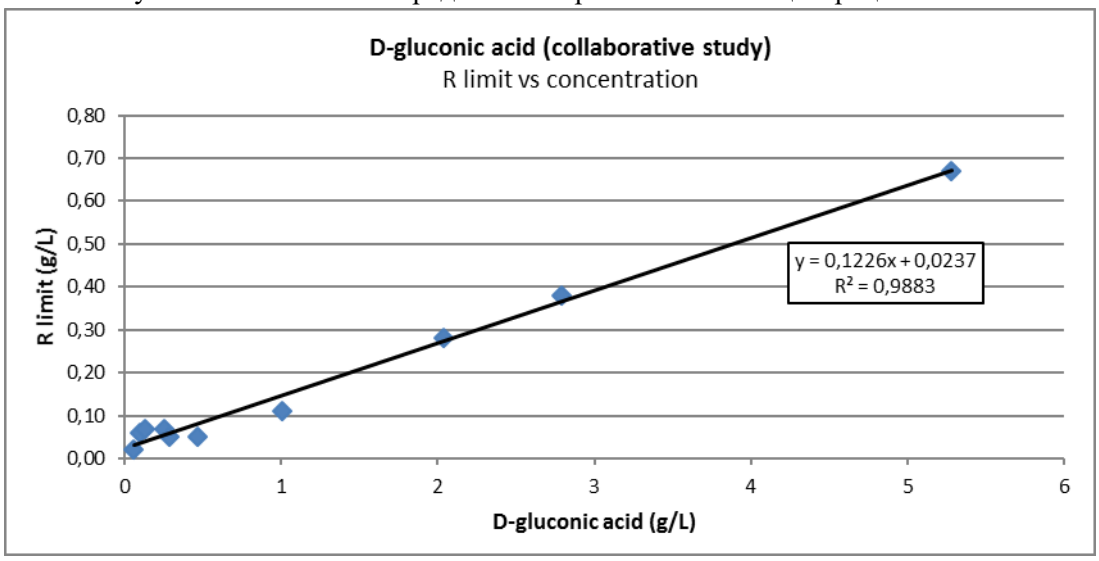


Рисунок 4: Зависимость предела воспроизводимости от концентрации

1.4. Результаты ручного метода

		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		1	**12**	**2**	**11**	**3**	**13**	**4**	**15**	**5**	**14**	**6**	**16**	**7**	**10**	**8**	**19**	**9**	**18**	**17**	**20**
	Проб №1	2.05	2.09	1.06	0.99	0.25	0.25	0.34	0.33	*0.10*	*0.12*	2.85	2.84	5.32	5.34	0.14	0.13	0.45	0.46	0.05	0.05
2	Проб №2	2.08	2.10	1.03	1.02	0.23	0.26	0.35	0.32	*0.09*	*0.10*	2.83	2.86	5.34	5.36	0.15	0.13	0.44	0.45	0.05	0.05
	(2)	**2.07**	**2.10**	**1.05**	**1.01**	**0.24**	**0.26**	**0.35**	**0.33**	**0.10**	**0.11**	**2.84**	**2.85**	**5.33**	**5.35**	**0.15**	**0.13**	**0.45**	**0.46**	**0.05**	**0.05**
	Проб №1	2.24	2.11	1.01	1.04	0.26	0.26	0.34	0.33	0.11	0.11	3.05	3.19	5.64	5.68	0.14	0.16	0.34	0.41	0.05	0.05
10	Проб №2	2.37	2.24	1.01	1.06	0.25	0.26	0.35	0.34	0.12	0.11	3.10	3.02	5.65	5.78	0.14	0.15	0.33	0.42	0.05	0.05
	(10)	**2.31**	**2.18**	**1.01**	**1.05**	**0.26**	**0.26**	**0.35**	**0.34**	**0.12**	**0.11**	**3.08**	**3.11**	**5.65**	**5.73**	**0.14**	**0.16**	**0.34**	**0.42**	**0.05**	**0.05**
	Проб №1	2.61	2.54	1.04	0.99	0.27	0.28	0.34	0.34	0.13	0.12	3.44	3.38	5.97	6.22	0.21	0.23	0.44	0.47	0.05	0.05
18	Проб №2	2.57	2.54	0.97	1.01	0.28	0.28	0.35	0.35	0.12	0.12	3.32	3.42	6.04	6.31	0.21	0.21	0.51	0.53	0.05	0.05
	(18)	**2.59**	**2.54**	**1.00**	**1.00**	**0.28**	**0.28**	**0.34**	**0.34**	**0.12**	**0.12**	**3.38**	**3.40**	**6.00**	**6.26**	**0.21**	**0.22**	**0.48**	**0.50**	**0.05**	**0.05**

Таблица полученных данных. Значения, выделенные курсивом, соответствуют результатам, удаленным из-за выбросов отдельных значений согласно критериям обычного 2-стороннего теста Граббса и двойного теста Граббса (2-стороннего, P = 2,5%), а также в соответствии с тестом Кохрана (1-сторонний тест, где P = 2,5%).

Проба	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Допущенные лаборатории	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Количество повторений	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Минимальное значение	2.05	0.97	0.23	0.32	0.09	2.83	5.32	0.13	0.33	0.05
Максимальное значение	2.61	1.06	0.28	0.35	0.13	3.44	6.31	0.23	0.53	0.05
Среднее значение (г/л)	**2.29**	**1.02**	**0.26**	**0.34**	**0.11**	**3.11**	**5.72**	**0.17**	**0.44**	**0.05**
среднее квадратичное отклонение повторяемости r	0.06	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.11	0.01	0.03	-
Предел повторяемости r limit = 2 2* Sr	0.16	0.07	0.02	0.03	0.02	0.04	0.31	0.03	0.10	-
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSDr	0.03%	0.02%	0.03%	0.03%	0.06%	0.01%	0.02%	0.06%	0.08%	-
Среднее квадратичное отклонение воспроизводимости (SR)	0.25	0.02	0.02	0.01	0.01	0.27	0.41	0.04	0.06	-
Предел воспроизводимости R limit = 2 2* SR	0.70	0.07	0.05	0.03	0.03	0.77	1.14	0.12	0.17	-
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSDR	0.11%	0.02%	0.06%	0.03%	0.10%	0.09%	0.07%	0.26%	0.14%	-

Величина Horwitz повторяемости RSDr (%)	3.33%	3.76%	4.62%	4.44%	5.24%	3.18%	2.90%	4.94%	4.27%	-
Индекс воспроизводимости	0.77	0.60	0.55	0.61	1.09	0.16	0.67	1.21	1.82	-
Величина Horwitz воспроизводимости RSDR (%)	4.99%	5.64%	6.92%	6.66%	7.86%	4.77%	4.35%	7.41%	6.41%	-
Индекс воспроизводимости Horwitz R	2.18	0.42	0.93	0.47	1.30	1.85	1.63	3.46	2.22	-

S: среднее квадратичное отклонение / RSD: Относительное стандартное отклонение /
r: Предел повторяемости / R: Предел воспроизводимости.
Статистические параметры рассчитаны по данным результатов 3 лабораторий.

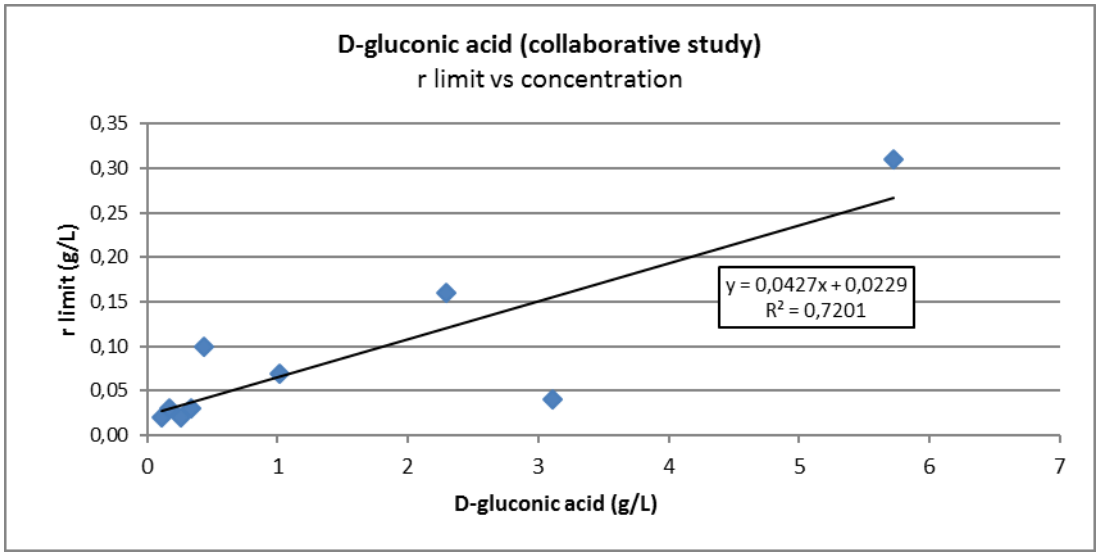


Рисунок 5: Зависимость предела повторяемости от концентрации

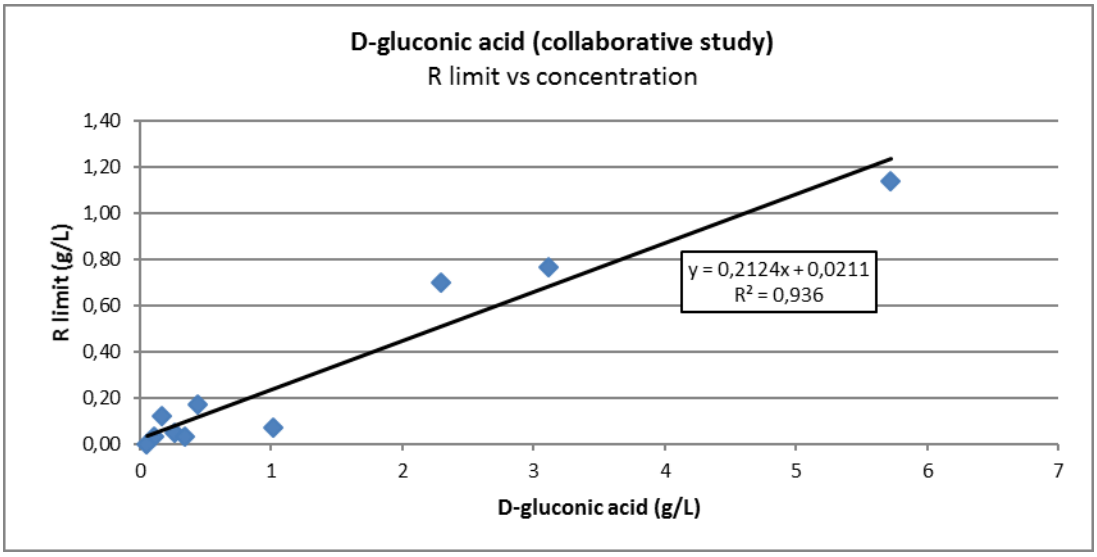


Рисунок 6: Зависимость предела воспроизводимости от концентрации

2. Библиография

International Organisation of Vine and Wine (OIV), *Compendium of international methods of wine and musts analysis*, Vol. 1 & 2, 2019.

International Organisation of Vine and Wine (OIV), 'Collaborative Study', *Compendium of international methods of wine and must analysis*, OIV-MA-AS1-07: R2000.

International Organisation of Vine and Wine (OIV), 'Protocol for the design, conducts and interpretation of collaborative studies,' *Compendium of international methods of wine and must analysis*, OIV-MA-AS1-09: R2000.

ISO 13528:2015 (E). Protocol for the design, conducts and interpretation of collaborative studies. Second Edition.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H. & Nury, F.S., *Wine analysis and production*, Van Nostrand Reinhold, 1st edition, 31 December, 1990.

Метод OIV-MA-AS314-01 Метод II типа

Углекислый газ

Пределы концентрации до 1,5 г/л
(A 39 измененный резолюцией oeno 21/2003 и дополненный резолюцией oeno 3/2006)

1. Сущность метода

1.1 Неигристые вина (избыточное давление $CO_2 \leq 0.5 \times 10^5$ Па*)

Объем вина, взятый из образца, охлаждается примерно до 0°C и смешивается с достаточным количеством гидроксида натрия до получения pH=10-11. Титрование проводится раствором кислоты в присутствии углекислого ангидраза. Содержание углекислого газа рассчитывается по объему кислоты, необходимой для изменения pH с 8,6 (бикарбонатная форма) до 4,0 (карбоновая кислота). Холостое титрование проводят в тех же условиях на декарбонизированном винет и считают объем раствора гидроксида натрия, поглощенного винными кислотами.

1.2 Игристые и полуигристые вина

Проба анализируемого вина охлаждается почти до точки замерзания. После удаления подпробы, которая используется в качестве холостой после декарбонизации, оставшуюся в бутылке часть подщелачивают, связывая тем самым диоксид углерода в форме Na2CO3. Титрование проводят раствором кислоты в присутствии угольной ангидразы.

Содержание углекислого газа рассчитывается исходя из объема раствора кислоты, необходимого для изменения pH с 8,6 (бикарбонатная форма) до 4,0 (углекислота). Холостое титрование в декарбонизированном вине проводится при тех же условиях и для определения объема гидроксида натрия, поглощенного винными кислотами.

2. Описание метода

2.1 Неигристые вина

(избыточное давление $CO_2 \leq 0.5 \times 10^5$ Па)

2.1.1 Оборудование

- Магнитная мешалка
- Измеритель pH

2.1.2 Реагенты

* 1 бар = 10^5 паскалей (Па)

- Раствор гидроксида натрия, 0,1 M

- Раствор серной кислоты, 0,05 М
- Раствор карбоновой ангидразы, 1 г/л

2.1.3 Проведение исследования

Охлаждают образец вина и пипетку для взятия пробы на 10 мл, примерно до 0°C. Помещают 25 мл раствора гидроксида натрия, 0,1 М, в мензурку емкостью 100 мл; добавляют две капли раствора карбоновой ангидразы, 1 г/л. Вносят 10 мл вина с помощью пипетки, охлажденной до 0°C.
Ставят мензурку на магнитную мешалку, погружают pH-электрод и магнитный стержень и умеренно перемешивают.
Когда жидкость достигнет комнатной температуры, медленно титруют раствором серной кислоты, 0,05 М, пока pH не достигнет 8,6. Записывают показания объёма, измеренного по бюретке.
Продолжают титрование серной кислотой, пока pH не достигнет 4,0. n - это содержание объема между pH 8,6 и 4,0.
Удаляют примерно 50 мл CO2 из образца вина путем встряхивания под вакуумом в течение трех минут, при этом колба должна быть нагрета на водяной бане до температуры около 25 °C. Проводят описанную выше процедуру с 10 мл декарбонизированного вина. n' - это полученный объем.

2.1.4 Выражение результатов

1 мл титрованного раствора гидроксида натрия, 0,05 М, соответствует 4,4 мг
CO2. Количество CO2 в граммах на литр вина определяется по формуле:

$0.44\ (n - n')$

Результат записывается с точностью до двух десятичных знаков.
Примечание*:* Для вин, которые содержат мало CO_2 ($CO_2 < 1$ г/л), добавление карбоновой ангидразы для катализа гидратации CO_2 не требуется.

2.2Игристые и полуигристые вина

2.2.1 Аппаратура

- Магнитная мешалка
- Измеритель pH

2.2.2 Реактивы

- Гидроксид натрия, 50% (м/м)
- Раствор серной кислоты, 0,05 М
- Раствор карбоновой ангидразы, 1 г/л

2.2.3 Проведение исследования

Отмеряют уровень вина в бутылке и охлаждают до начала замораживания. Дают бутылке немного подогреться, пока не исчезнут кристаллы льда.
Быстро снимают пробку и помещают 45 - 50 мл вина в измерительный цилиндр для холостого титрования. Точный вытесненный объем, *v* мл, определяется по шкале мензурки после его возвращения к комнатной температуре. Сразу после удаления пустого образца добавляют 20 мл раствора гидроксида натрия в бутылку объемом 750 мл.

Дают вину достичь комнатной температуры.

Помещают 30 мл кипяченой дистиллированной воды и две капли раствора карбоангидразы в мензурку емкостью 100 мл. Добавляют 10 мл вина, которое было доведено до щелочного состояния. Ставят мензурку на магнитную мешалку, устанавливают электрод и магнитный стержень и медленно перемешивают.

Медленно титрируют раствором серной кислоты, 0,05 М, до достижения pH 8,6. Фиксируют показания бюретки.

Продолжают медленно титровать серной кислотой, 0,05 М, до достижения pH 4.0. *n,* мл — это объем, добавленный между pH 8,6 и 4,0.

Удаляют CO_2 из образца вина, положенного на бок для холостого титрования путем перемешивания под вакуумом в течение трех минут, при этом колба должна нагреваться на водяной бане при температуре около 25 °C.

Удаляют 10 мл декарбонизированного вина и добавляют к 30 мл кипяченой дистиллированной воды две-три капли 50% раствора гидроксида натрия, чтобы довести pH до 10-11. Затем выполняют описанную выше процедуру. n' - это объем добавленной серной кислоты, 0,05 М.

2.2.4 Запись результатов

1 мл серной кислоты, 0,05 М, соответствует 4,4 мг CO2.

Опорожняют бутылку ощелоченного вина и определяют в пределах 1 мл начальный объем вина, сделав до отметки водой. Количество CO_2 в граммах на литр вина выражается по следующей формуле:

$$0.44\ (n - n')\ x \quad \frac{V - v + 20}{V - v}$$

Результат записывается с точностью до двух знаков после запятой.

2.3 Выражение результатов

Избыточное давление при 20°C ($Paph_{20}$), выраженное в Паскалях, задается формулой:

$$Paph20 = \frac{Q}{1{,}951 \times 10{-}5\ (0{,}86 - 0{,}01A)\ (1 - 0{,}00144\ S)} - Patm$$

где:
Q = содержание CO_2 в г/л вина,
A = алкогольная крепость вина при 20 °C,
S = содержание сахара в вине в г/л,
Patm= атмосферное давление, выраженное в паскалях.

2.4 Примечание

Описанная ниже процедура может использоваться в качестве стандартной для вин, содержащих менее 4 г на литр углекислого газа.

Готовят два образца вина для анализа.

Открывают один из образцов после охлаждения примерно до 5°C и немедленно добавляют 5 мл раствора гидроксида натрия, 50% (м/м), на 375 мл образца. Закупоривают и перемешивают. Помещают 10 мл обработанного таким образом вина в мензурку, содержащую 40 мл воды, и добавляют 3 капли раствора карбоновой ангидразы, 0,1 мг/мл. Титруют раствором серной кислоты, 0,02275 М, до достижения pH 8,6, затем продолжают титрование до pH 4,0. Объем, используемый для изменения pH от 8,6 до 4,0, составляет n мл.

Удаляют углекислый газ примерно из 25 мл вина, взятого из второго образца, путем перемешивания под вакуумом примерно 1 мин. в колбе емкостью 500 мл, содержащей 3 капли раствора карбоновой ангидразы. Добавляют 0,33 мл гидроксида натрия, 50% (м/м). Применяют описанную выше процедуру титрования к 10 мл декарбонизированного вина. n' мл - это объем использованной H2SO4, 0,02275 М. 1 мл соответствует 200 мг диоксида углерода на 1 литр. Количество вина, проанализированного на диоксид углерода, в миллиграммах на литр равно:

$$(n - n') \times 200 \times 1.013$$

БИБЛИОГРАФИЯ

Эталонный метод:

CAPUTI A, UEDA M., WALTER P. & BROWN T., *Amer. J. Enol. Vitic.,* 1970, **21,** 140-144.

SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1973, n° 350.

GORANOV N., *F.V., O.I.V.,* 1983, n° 758.

BRUN S. & TEP Y., *F.V., O.I.V.,* 1981, n° 736 & 1982, n° 736 (bis).

- Совместное исследование -

Титриметрическое определение углекислого газа в игристых и полуигристых винах

- Отчет о результатах -

Цель исследования

Целью исследования является определение характеристик повторяемости и воспроизводимости эталонного метода (MA-E-AS314-01-DIOCAR) для титриметрического определения CO_2 в игристых и полуигристых винах.
МОВВ определения и предельные значения содержания CO_2 приведены в резолюции OENO 1/2002.

Задачи исследования

Эталонный метод определения CO_2 не содержит точных данных. Поэтому было решено провести совместное исследование.
В связи с особенностями анализа, традиционный протокол валидации не мог быть полностью соблюден. Только одну независимую экспертизу можно было провести из одной бутылки образца. Каждая бутылка рассматривалась в отдельности. Поэтому проверка однородности в рамках предварительных исследований для совместных исследований была невозможна. Для получения однородного тестового материала необходимо было тесное сотрудничество с производителями. Образцы были получены во время наполнения бутылок на линии розлива за очень короткий промежуток времени, поэтому можем предположить, что CO2 распределен во всех бутылках однородно.
Данное исследование было задумано как слепое двойное испытание. Полная анонимность образцов не могла быть гарантирована, поскольку участвующие партнеры использовали различные типы бутылок и/или пробок для разных образцов. Поэтому нам пришлось положиться на честность участвующих лабораторий, которым было предложено провести анализ данных независимо, без каких-либо изменений данных.

Область применения и актуальность

1. Метод является количественным.
2. Метод применим для определения содержания CO_2 в игристых и полуигристых винах с целью проверки соблюдения стандартов.

1. Материалы и матрицы

Совместное исследование включало 6 различных образцов. Все образцы были направлены двойным слепым методом, поэтому в общей сложности участникам было представлено 12 бутылок.

Таблица 1. Образцы и кодирование

Образец	Код бутылки	Вид
ОБРАЗЕЦ A	(Код 1 + 9)	игристое вино
ОБРАЗЕЦ B	(Код 2 + 5)	полуигристое вино (“искристое”)
ОБРАЗЕЦ C	(Код 3 + 4)	игристое вино
ОБРАЗЕЦ D	(Код 6 + 10)	полуигристое вино (“искристое”)
ОБРАЗЕЦ E	(Код 7 + 11)	полуигристое вино (“искристое”)
ОБРАЗЕЦ F	(Код 8 + 12)	игристое вино (красное)

Меры контроля

Рассмотренный метод уже подтвержден на практике. В рамках совместного исследования необходимо было определить только недостающие точные данные. Предварительное исследование не требовалось, поскольку большинство лабораторий уже использовали эталонный метод в стандартном анализе.

Используемый метод и вспомогательные документы

Участникам были выданы вспомогательные документы (Сопроводительное письмо с рекомендациями о методах анализа, бланк получения образцов и лист результатов).
Содержание CO_2 выражалось в г/л.

Анализ данных

1. Определение выбросов оценивалось с помощью тестов Кохрана, Граббса и парных тестов Граббса.
2. Для получения данных о повторяемости и воспроизводимости был проведен

статистический анализ.

3. Были рассчитаны значения Горвица.

Участники

В совместном исследовании приняли участие 13 лабораторий из нескольких разных стран. Лабораториям были присвоены кодовые номера лабораторий. Участвующие лаборатории имеют проверенный опыт анализа CO_2 в игристых винах.

Таблица 2. Список участников

Landesuntersuchungsamt D-56068 Koblenz GERMANY	Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittelprüfung D-55129 Mainz GERMANY
Landesuntersuchungsamt D-67346 Speyer GERMANY	Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen D-10557 BERLIN GERMANY
Servicio Central de Viticultura y Enologia E-08720 Villafranca Del Pendes SPAIN	Landesuntersuchungsamt D-54295 Trier GERMANY
Landesuntersuchungsamt D-85764 Oberschleißheim GERMANY	Instituto Agrario di S. Michele I-38010 S. Michele all Adige ITALIA
Chemisches Landes- u. Staatl. Veterinäruntersuchungsamt D-48151 Münster GERMANY	Ispettorato Centrale Repressione Frodi I-31015 Conegliano (Treviso) ITALY
Bundesamt für Weinbau A-7000 Eisenstadt AUTRIA	BgVV D-14195 Berlin GERMANY
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt D-70736 Fellbach GERMANY	

Результаты

Данные неопределенности рассчитаны непосредственно для определения CO_2 на основе представленных результатов. Для оценки совместного исследования имеет значение коэффициент Горвица. Для всех образцов было получено отношение r и R < 2, достоверное для совместного исследования. В таблице 3 приведены результаты титрования CO_2 для каждого образца.

Таблица 3. Обобщены результаты определения CO_2

CO_2	ОБР. E A	ОБР. E B	ОБР. E C	ОБР. E D	ОБР. E E	ОБР. E F
Mean [г/л]	9.401	3.344	9.328	4.382	4.645	8.642
r [г/л]	0.626	0.180	0.560	0.407	0.365	0.327
sr [г/л]	0.224	0.064	0.200	0.145	0.130	0.117
RSDr %	2.379	1.921	2.145	3.314	2.803	1.352
Hor	0.893	0.617	0.804	1.109	0.946	0.501
R [г/л]	1.323	0.588	0.768	0.888	0.999	0.718
sR [г/л]	0.473	0.210	0.274	0.317	0.357	0.256
RSDR %	5.028	6.276	2.942	7.239	7.680	2.967
HoR	1.245	1.331	0.728	1.599	1.711	0.726

Метод OIV-MA-AS314-02 Метод I типа

Измерение избыточного давления игристых вин

(Резолюция Oeno 21/2003)

1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

После термической стабилизации и перемешивания бутылки избыточное давление измеряют с помощью аффрометра (манометра). Выражается в паскалях (Па) (способ 1 типа).

2. АППАРАТУРА

Прибор, который измеряет избыточное давление в бутылках с игристыми и полуигристыми винами, называется аффрометром. Он может быть разных форм в зависимости от пробки бутылки (металлическая капсула, кроненкорка, пластиковая или корковая пробка).

2. 1. Бутылки с капсулами

Прибор состоит из трех частей (рисунок 1):

- Верхняя часть (держатель винтовой иглы) состоит из манометра, ручного затягивающего кольца, шнека, который вставляется в среднюю часть, и иглы, которая проходит через капсулу. Игла имеет боковое отверстие, через которое передается давление на манометр.
Соединение обеспечивает герметичность всего устройства с капсулой бутылки.

- Средняя часть (или гайка) позволяет центрировать верхнюю часть.
Она вкручивается в нижнюю часть, которая прочно удерживает бутылку.
- Нижняя часть (зажим) оснащена шипом, который проскальзывает под кольцом бутылки, чтобы удержать все вместе. Существуют кольца, подходящие для любого типа бутылок.

2. 2. Бутылки с пробками

Прибор состоит из двух частей (рисунок 2):
- Верхняя часть идентична предыдущему прибору, но игла длиннее. Она

состоит из длинной полой трубки со щупом на одном конце для прохода через пробку. Щуп двигается и попадает в вино после прокола пробки.

- Нижняя часть состоит из гайки и основания, сидящего на пробке. Она снабжена четырьмя затяжными винтами для удержания прибора на пробке.

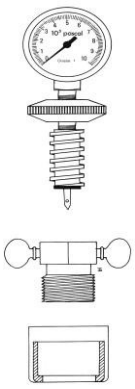


Рисунок 1
Афрометр для замера через капсулу

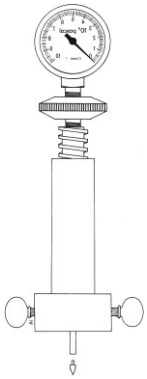


Рисунок 2
Афрометр для замера через пробку

Замечания относительно манометров, которыми оснащаются два типа приборов:

- *Они могут быть как механической трубкой Бурдона, так и цифровыми пьезоэлектрическими датчиками. В первом случае трубка Бурдона должна быть изготовлена из нержавеющей стали.*
- *Градуируется в Паскалях (Па). Для игристого вина более удобно пользоваться единицами измерений 10^5 паскаль (10^5 Па) или килопаскалями (кПа).*
- *Афрометры могут быть разных классов. Класс манометра - это допустимый процент погрешности измерения от шкалы измерения, выраженной в процентах (например, манометр на 1000 кПа класса 1, при максимально полезном давлении в 1000 кПа допускает погрешность ± 10 кПа). Класс 1 рекомендуется для точных измерений.*

3. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерения проводят в бутылках при стабилизированной в течение 24 часов температуре.

После прокалывания кроненкорки, корковой или пластиковой пробки бутылку энергично встряхивают для достижения постоянного избыточного давления

перед снятием показаний.

3.1. Укупоренные бутылки

Просовывают зубчатые крепления хомута под кольцо бутылки. Затягивают гайку до тех пор, пока все не будет плотно прилегать к бутылке.
Верхняя часть накручивается на гайку. Во избежание потерь газа следует прокалывать капсулу очень быстро и обеспечить соединение с капсулой. Для снятия показаний необходимо энергично встряхнуть бутылку для достижения постоянного избыточного давления.

3.2. Бутылки с пробкой

Помещают щуп на конец иглы. Располагают это приспособление на пробке.
Затягивают четыре винта на пробке.
Затягивают верхнюю часть (игла проходит через пробку). Щуп должен опуститься в бутылку и передать давление на манометр. После встряхивания бутылки до достижения постоянного избыточного давления снимают показания.
Возвращают щуп на место после снятия показаний.

4. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Избыточное давление при 20°C ($Paph_{20}$) выражается в паскалях (Па) или в килопаскалях (кПа). Показатели должны соответствовать точности манометра
(например: 6.3 10^5 Па или 630 кПа, а не 6,33 10^5 Па или 633 кПа для манометра 1000 кПа полной шкалы, класса 1).

Если измерение температуры отлично от 20°C, необходимо исправить, умножив измеренное давление на соответствующий коэффициент (см. таблицу 1).

0	1.85	13	1.24
1	1.80	14	1.20
2	1.74	15	1.16
3	1.68	16	1.13
4	1.64	17	1.09
5	1.59	18	1.06
6	1.54	19	1.03
7	1.50	20	1.00
8	1.45	21	0.97
9	1.40	22	0.95
10	1.36	23	0.93
11	1.32	24	0.91
12	1.28	25	0.88

ТАБЛИЦА 1: Соотношение избыточного давления $Paph_{20}$ в полуигристном и игристом вине при температуре 20°C с избыточным давлением $Paph_t$ при температуре *t*

5. КОНТРОЛЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метод прямого определения физических параметров (метод критериев 1-го типа)

Проверка афрометров

Афрометры следует поверять регулярно (не реже одного раза в год).

Для поверки используются испытательные стенды. Это позволяет сравнить поверяемый манометр с эталонным манометром более высокого класса, соответствующим установленным национальным стандартам.

При помощи контроля проверяются значения, показываемые двумя аппаратами, а также увеличивающееся или уменьшающееся давление относительно друг друга. Если между ними существует разница, может быть произведена корректировка для внесения необходимых изменений.

Лаборатории и уполномоченные органы оснащены такими испытательными стендами, которые также можно приобрести у производителей манометров.

Метод OIV-MA-AS314-03 Метод II типа

Определение соотношения изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ в CO_2 игристых вин Метод с использованием масс-спектрометрии изотопного отношения (IRMS)

(Резолюция Oeno 7/2005, в редакции OIV-OENO 512-2014)

Предисловие

С согласия всех лабораторий, участвующих в совместном исследовании МОВВ, был подготовлен следующий стандартный метод:

^{13}C-IRMS анализ CO_2 в игристых винах (2003-2004 годы).

Введение

Свободное пространство над вином в бутылке игристого содержит богатую на CO_2 газообразную фазу, которая находится в равновесии с CO_2, растворенным в жидкой фазе. Этот газ образуется во время второй ферментации, индуцированной добавлением сахара из винограда, свеклы, сахарного тростника или кукурузы. Однако содержание CO_2 в игристых винах может быть увеличено искусственно с помощью CO_2 фабричного производства.

В 1997 году МОВВ был представлен автономный метод определения изотопного соотношения $^{13}C/^{12}C$ и CO_2 в игристых винах с помощью изотопной масс-спектрометрии (IRMS). Данный метод привел к появлению новых процедур испытаний, основанных на автоматизированных on-line методах, разработанных в некоторых европейских лабораториях. Одна из таких процедур была представлена МОВВ в 2001 году. Технический прогресс ближайших нескольких лет вполне может привести к новым процедурам надежного и быстрого определения изотопного соотношения $^{13}C/^{12}C$ в многочисленных образцах CO_2. Исчерпывающее описание всех применяемых процедур для различных методов сопряжено с риском быстрого вытеснения метода. Данный метод учитывает это обстоятельство и описывает основные принципы правильного измерения содержания углерода-13 в CO_2 игристого вина, включает краткое описание процедур, используемых в настоящее время, и, в качестве примера, подробное описание используемых процедур, управляемый вручную и автоматически.

1. Область применения

Данный метод определяет соотношение стабильных изотопов углерода

($^{13}C/^{12}C$) в CO_2 игристых вин с помощью изотопной масс-спектрометрии (IRMS). Метод включает в себя ряд процедур, использование которых зависит от доступных инструментов.

2. Нормативные ссылки

ISO 5725-2:1994 «Точность (истинность и точность) методов и результатов измерений. Часть 2: Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения».

ISO 8-2:1999 «Химия - Макеты стандартов - Часть 2: Методы химического анализа».

3. Определения

$^{13}C/^{12}C$: соотношение изотопов углерода 13 к углероду 12 рассматриваемого образца;

^{13}C: содержание углерода 13 (13C), выраженное в частях на мил (‰).

1 мил (0,001 дюйма) (= 0, 02539 мм);

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite. Стандарт PDB представляет собой ископаемый карбонат кальция из Южной Каролины, США с соотношением изотопов ($^{13}C/^{12}C$ или R_{PDB}) = 0.0112372. Это значение является точкой отсчета для общего значения ^{13}C международной шкалы PDB, выраженного в частях на мил (‰);

m/z: отношение массы к заряду;

S_r: стандартное отклонение повторяемости. Стандартное отклонение результатов испытаний, полученных в условиях повторяемости (условий, когда независимые результаты испытаний получены одним и тем же методом на идентичных образцах испытаний в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в течение коротких промежутков времени).

r: Предел повторяемости. Значение, меньшее или равное которому можно ожидать с вероятностью 95%, не превышается абсолютной величиной разности между двумя результатами испытаний, полученными в условиях повторяемости; $r=2.8 \cdot Sr$.

SR: стандартное отклонения воспроизводимости. Стандартное отклонение результатов испытаний, полученных в условиях воспроизводимости (условиях, когда результаты испытаний получены одним и тем же методом на идентичных образцах испытаний в разных лабораториях и с разными операторами, использующими разное оборудование).

R: Предел воспроизводимости. Значение, меньшее или равное которому можно ожидать с вероятностью 95%, не превышается абсолютной величиной разности между двумя результатами испытаний, полученными в условиях воспроизводимости; $R=2.8 \cdot S_R$

4. Сущность метода

Растения классифицируются как C3 и C4 в зависимости от пути синтеза сахара. Сахар из растений C3, таких как виноград и свекла, имеет более низкое содержание ^{13}C, чем сахар из растений C4, таких как тростниковый сахар и

кукуруза. Разница сохраняется в содержании ^{13}C продуктов ферментации сахаров, таких как этанол и CO_2. Более того, промышленный CO_2, используемый в пищевой промышленности и получаемый при сжигании ископаемого топлива или при термической обработке карбонатов, имеет содержание ^{13}C, отличное от продуктов из растений C3 и C4. Следовательно, изотопное соотношение CO_2 $^{13}C/^{12}C$ игристого вина определяется типом сахара, используемым при второй ферментации (C3 или C4), или изотопным составом добавленного промышленного CO_2.

Исследования, проведенные до настоящего времени по содержанию^{13}C CO_2 в игристом вине, показали, что CO_2, полученный ферментацией сахара из растений C3, имеет ^{13}C в пределах от -17‰ до -26‰, тогда как CO_2, полученный путем ферментации сахара из растений C4, имеет ^{13}C в пределах от -7‰ до -10‰. Вина с газом имеют $^{13}C/^{12}C$ соотношение изотопов ниже -29‰ или выше -10‰, в зависимости от источника углекислого газа[1-4]. Поэтому измерение соотношения стабильных изотопов углерода ($^{13}C/^{12}C$) CO_2 игристых вин может быть хорошим методом для определения происхождения газа.

Содержание ^{13}C определяется из углекислого газа, полученного из игристого вина. Различные возможные комбинации изотопов ^{18}O, ^{17}O, ^{16}O and ^{13}C, ^{12}C приводят к массе 44, соответствующей изотопомеру $^{12}C^{16}O_2$, массе 45, соответствующей видам $^{13}C^{16}O_2$ и $^{12}C^{17}O^{16}O$, и массе 46 для изотопомера $1^{12}C^{16}O^{18}O$ ($^{13}C^{17}O^{16}O$ и $^{12}C^{17}O_2$ могут быть проигнорированы из-за их очень малой распространённости). Соответствующие ионные токи определяются на трех различных коллекторах. Ионный ток m/z 45 корректируется с учетом $12C^{17}O^{16}O$, который вычисляется из силы тока, измеренного для m/z 46, с учетом относительного содержания ^{18}O и ^{17}O (поправка Крейга). Сравнение с эталоном, откалиброванным по международному стандарту V-PDB, позволяет рассчитать содержание ^{13}C по относительной шкале ^{13}C ‰.

1. Реагенты и материалы

Материалы и расходные материалы зависят от оборудования, используемого в лаборатории.

При разделении и очистке образцов CO_2 путем криотраппинга в вакуумной лини используются следующие реагенты:

- Жидкий азот
- Этанол
- Твердый CO2

В общем, следующие расходные материалы используются для анализа с любой системой непрерывной подачи (EA-IRMS или GC-C-IRMS). Другие материалы аналогичного качества могут заменить любой продукт из этого списка:

- Гелий для анализа (CAS 07440-59-7)
- Кислород для анализа (CAS 07782-44-7)
- Углекислый газ для анализа используется в качестве вторичного эталонного газа по содержанию углерода-13 (CAS 00124-38-9).
- Окисляющий реагент для печи системы сгорания, например оксид меди для микроанализа (CAS 1317-38-0).
- Влагопоглотители для удаления воды, образующейся при сгорании: например, перхлорат магния для микроанализа (CAS 10034-81-4). В этом нет необходимости, когда системы EA-IRMS or the GC-C-IRMS удаляют воду путем криотраппинга.
- Капиллярная колонка и мембрана Нафиона для удаления воды, образующейся при сгорании в системах GC-C-IRMS systems.

Эталонный газ, используемый в измерениях, может быть сертифицированным газом или рабочим эталонным газом, откалиброванным по международным стандартам с известными значениями дельты (сертифицированные газы или эталонные материалы). Некоторые международные эталонные материалы, которые могут быть использованы для калибровки эталонного газа и контроля калибровки эталонного газа, следующие:

Код образца	Материал	$\delta^{13}C_{PDB}$	
IMEP-8-A	CO_2	-6.40‰	из Messer Griesheim
ISO-TOP	CO_2	-25.7‰	
BCR-656	Этанол	-20.91‰	из IRMM
BCR-657	Глюкоза	-10.76‰	
SAI-692C	CO_2	-10.96‰	из Oztech Trading Coorporation (США)
NBS-22	Масло	-29.7‰	из IAEA
IAEA-CH-6 (ANU)	Сахароза	10.4‰	
NBS-18	Кальцит	-5.1‰	
NBS-19	TS- известняк	+1.95‰	

FID-Mix	смесь н-алканов в изооктаноле	из Varian
C14	-29.61‰	
C15	-25.51‰	
C16	-33.39‰	

2. Аппаратура

Обычно используются следующие лабораторные приборы для измерения соотношения изотопов углерода:

- оборудование массовой спектрометрии изоотопного соотношения (IRMS), с возможностью определения содержания ^{13}C в распространённом в природе газообразном CO_2, с внутренней точностью до 0,05 ‰ и больше (выраженного в относительных величинах). Внутренняя точность здесь определяется как разница между двумя измерениями одного и того же образца CO2.

  Масс-спектрометр обычно снабжается тройным коллектором для одновременного измерения силы тока для m/z 44, 45 и 46. Масс-спектрометр должен быть также оснащен системой с двумя входами для попеременного измерения неизвестного образца и стандарта или использовать метод непрерывного потока (CF-IRMS).

- Системы непрерывного потока (CF-IRMS). Такие системы могут использоваться с автоматизированной системой отбора проб газа. Доступны несколько коммерческих разработок CF-IRMS, подходящих для применения настоящего метода:
  - GC-C-IRMS (газовая хроматография - сжигание - IRMS)
  - EA-IRMS (Элементный анализатор, оборудованный для введения жидких или твердых веществ).

  Данные системы отделяют и очищают CO_2 и элюируют полученный углекислый газ в ионизационную камеру спектрометра.

  Пробоотборник газа-IRMS**.** Периферийная система может быть использована для подготовки газа в режиме реального времени (он-лайн система), выделения CO_2 и введения CO_2 в масс-спектрометр изотопного соотношения.

- Стеклянный или стальной вакуумпровод с криогенными ловушками и подключением к насосу, может получать давление ниже 5.10^{-3} мбар.
- Устройства для отбора проб газа, коммерчески доступные (например, шприц для образцов газа) или разработанные собственными силами и способные извлекать аликвоту CO2 из игристого вина без изотопного фракционирования.
- Герметичные флаконы для газовых проб, адаптируемые на газовых автосамплерах к системам непрерывного потока.
- Герметичные флаконы для аликвот игристого вина, адаптируемые к вакуумпроводу и/или газовому автодозатору для систем непрерывного потока.

7.Проведение исследования

Предлагаемый метод включает три этапа: отбор проб CO2, очистка и разделение CO2, измерение соотношения $^{13}C/^{12}C$. Эти шаги могут быть полностью независимыми (офф-лайн система) или полностью / частично подключенными (он-лайн система). Может использоваться любая процедура, позволяющая избежать изотопного фракционирования образца CO2 в ходе трех этапов метода. Подробная информация о конкретных процедурах, основанных на автономных системах и системах CF, приводится в приложениях A, B и C.

Приведенное ниже описание относится к процедурам, используемым лабораториями-участницами в межлабораторном испытании.

7.1. Процедуры отбора проб CO_2:

а. Отбор проб CO_2 при комнатной температуре из верхнего пространства бутылки путем введения специального устройства через пробку, или

б. Отбор проб CO2 из верхнего пространства бутылки после удаления пробки и закупорки бутылки газонепроницаемым прецизионным замком, соединенным с устройством для отбора проб. Перед заменой запорного устройства бутылка игристого вина должна быть охлаждена до температуры ниже 0ºC, а затем нагрета до комнатной температуры. Аликвоту газа, собранного в пробоотборном устройстве, отбирают газонепроницаемым шприцем и вводят в герметичный GC-флакон, или

в. Отбор пробы CO_2 из аликвоты игристого вина. Бутылка игристого вина должна быть охлаждена до 4º-5ºC перед удалением пробки. Аликвоту вина помещают в специальную бутылку, адаптированную к стеклянному вакуумпроводу или к газовому автоматическому пробоотборнику.

г. Охлаждают образец при температуре 4-5 °C, быстро переносят жидкость в пробирку, герметично закрыв ее пробкой с тефлон-силиконовой крышкой. Затем часть жидкости из этих 50 мл переносят в пробирку объемом 10 мл и анализируют. При необходимости пробирку заполняют гелием для удаления атмосферного CO_2.

д. После охлаждения пробы флакон открывают при комнатной температуре и с помощью пипетки отбирают 200 мкл жидкости и помещают в подходящие пробирки. Пробирки немедленно запечатывают, затем помещают в ультразвуковую ванну на 10 мин перед анализом.

Статистические результаты межлабораторных испытаний для процедур отбора проб 7.1.d и 7.1.e приведены в ПРИЛОЖЕНИИ E.

7.2. Процедуры очистки и разделения CO_2

а. Неконденсированные газы и вода, присутствующие в газовой пробе, удаляются в вакуумпроводе с помощью криогенных ловушек, или

б. Образцы газа очищаются, а выделение CO2 осуществляется с помощью различных онлайн-систем, которые подключаются к IRMS с помощью непрерывного потока или криогенной ловушки. Некоторые из онлайн-

систем, которые можно использовать, следующие:

- криогенная ловушка для воды в режиме он-лайн с системой непрерывного потока
- ловушка для воды (перхлорат магния) с подключенным газовым хроматографом
- газовый хроматограф, подключенный либо непосредственно к IRMS, либо с помощью интерфейса сгорания.
- газовый хроматограф, подключенный непосредственно к IRMS, или посредством интерфейса горения.

7.3. Измерение соотношения $^{13}C/^{12}C$:

Соотношение изотопов углерода CO_2, полученное из игристого вина, измеряется с помощью масс-спектрометра изотопного соотношения.

8. Расчеты

Выражают соотношение изотопов $^{13}C/^{12}C$ для CO_2 из игристого вина как отклонение от рабочей нормы (^{13}C), предварительно откалиброванных по международному стандарту PDB. Согласно стандарту PDB этот параметр определяется как относительная разница на 1 тысячу между соотношениями ^{13}C и ^{12}C образца. Стандарт PDB — это ископаемый карбонат кальция из штата Южная Каролина в США с изотопным отношением (R_{PDB}) = 0,0112372. Это значение является точкой отсчета в общей международной шкале PDB для □ ^{13}C и выражается в частях на мил (‰).

Значения □ ^{13}C, выраженные по отношению к рабочему стандарту, рассчитываются с помощью следующего уравнения:

$$□^{13}C_{sam/ref}\ (‰) = 1000 \times (R_{sam} - R_{ref}) / R_{ref},$$

где

R_{sam} — $^{13}C/^{12}C$ соотношение изотопов в исследуемой части;

R_{ref} — $^{13}C/^{12}C$ соотношение изотопов рабочего стандарта.

Значения □ ^{13}C, выраженные по отношению к стандарту PDB, рассчитываются с Помощью следующего уравнения:

$$□^{13}C^{sam/V\text{-}PDB}\ (‰) = □^{13}C^{sam/ref} + □^{13}C^{ref/V\text{-}PDB} + (□^{13}C^{sam/ref} \times □^{13}C^{ref/V\text{-}PDB})/1000,$$

где

$\square^{13}C_{ref/V\text{-}PDB}$ - изотопное отклонение рабочего стандарта, ранее определенного от стандарта PDB, выраженное в частях на мил (‰).

Результаты выражаются с точностью до двух знаков после запятой.

9. Прецизионность

Подробная информация о межлабораторном испытании точности метода приводится в приложениях D и E.

9.1. Повторяемость

Абсолютная разница между двумя единичными результатами, обнаруженными на идентичном образце испытаний одним оператором, использующим одно и то же устройство, в течение кратчайшего возможного временного интервала превышает предел повторяемости *r* не более чем в 5% случаев.

Допустимые средние значения стандартного отклонения повторяемости (S_r) и предела повторяемости (r) равны:

S_r = 0.21‰ r = 0.58‰
Характеристики процедур отбора проб 7.1.a-c

S_r = 0.21‰ r = 0.56‰
Характеристики процедур отбора проб 7.1d and 7.1e

9.2. Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя единичными результатами, обнаруженными на идентичном тестовом образце, о котором сообщили две лаборатории, превышает воспроизводимость *R* не более чем в 5% случаев.

Допустимые средние значения стандартного отклонения воспроизводимости (S_R) и предела воспроизводимости (R) равны:

S_R = 0.47‰ R = 1.33‰
Характеристики процедур отбора проб 7.1.a-c

S_R = 0.68‰ R = 1.91‰
Характеристики процедур отбора проб 7.1d and 7.1e

10. Протокол испытаний

Протокол испытания должен содержать следующие данные:

10.1. всю информацию, необходимую для идентификации испытуемого образца;

10.2. ссылку на Международный стандартный метод;

10.3. используемый метод, включая процедуру отбора проб и измерений, используемую приборную систему;

10.4. результаты испытания и единицы измерения, в том числе результаты отдельных измерений и их среднее значение, рассчитанное в соответствии с пунктом 8 («Вычисления»);

10.5. любые отклонения от указанной процедуры;

10.6. любые необычные особенности, замеченные во время испытания;

10.7. дату испытания;

10.8. была ли проверена повторяемость;

10.9. описание процедуры калибровки эталонного газа, используемого для измерения испытательных порций

Приложения (A, B, C, D, E)

11. Библиография

1. *Mesure du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du gaz carbonique des vins mousseux et des vins gazéifiés. J. Merin and S. Mínguez. Office International de la Vigne et du Vin. Paris. F.V. 1039, 2426/200297 (1997).*
2. *Examination of the $^{13}C/^{12}C$ isotopes in sparkling and semi-sparkling wine with the aid of simple on-line sampling. M. Boner and H. Förstel. Office International de la Vigne et du Vin. Paris. F.V. 1152. (2001).*
3. *Use of $^{13}C/^{12}C$ ratios for studying the origin of CO_2 in sparkling wines. J.Dunbar. Fresenius Z. Anal. Chem., 311, 578-580 (1982).*
4. *Contribution to the study of the origin of CO_2 in sparkling wines by determination of the $^{13}C/^{12}C$ isotope ratio. I. González-Martin, C. González- Pérez, E. Marqués-Macías. J. Agric. Food Chem. 45, 1149-1151 (1997).*
5. *Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance studies. Pure Appl. Chem., 1995, 67, 331-343.*

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Экспериментальная процедура на основе автономных систем отбора проб и измерений

(пробоотборник "собственного производства", автономная вакуумная линия и IRMS с двойным входом)

1. Материалы

- Устройство для отбора проб. Устройство, которое будет использоваться для отбора аликвоты газа из бутылки, состоит из полого пуансона (стальной иглы) с тремя боковыми отверстиями, через которые поступает газ. Он соединен с системой клапанов, состоящей из двух последовательно соединенных клапанов, и имеет емкость около 1 мл. Один клапан прикреплен к пуансону (клапан 1), а другой - к стальной трубке (клапан 2), которая соединяет прибор с вакуумпроводом. Для стеклянного вакуумпровода потребуется переходник с гибкой стальной трубкой. На рисунке показано устройство для сбора газа.
- Автономный вакуумпровод с двумя криогенными ловушками (P<0,05 мбар). Можно использовать два типа вакуумпровода: стеклянный или стальной вакуумпровод.
- Масс-спектрометр с двойным входом и с изотопным соотношением, с возможностью определять содержание ^{13}C в газе CO_2 при естественном содержании с внутренней точностью до 0,05‰ и более (выражается относительным значением δ). Внутренняя точность здесь определяется как разница между двумя измерениями одного и того же образца CO_2.

2. Проведение исследования (см. рисунок)

2.1. Отбор проб CO_2:

1. Подключают пробоотборник к вакуумпроводу и проверяют его герметичность.
2. Вставляют пробоотборник с закрытыми клапанами в пробку бутылки круговыми движениями, сохраняя при этом устройство в вертикальном положении.
3. Подсоединяют узел пробоотборник-бутылка вина к вакуумпроводу и откачивают воздух из линии и резервуара, ограниченного двумя клапанами (клапан 2 открыт, а клапан 1 закрыт).
4. Как только в резервуаре будет создан вакуум, закрывают клапан 2 и открывают клапан 1, поддерживают эту схему включения в течение 1 мин. По истечении времени равновесия закрывают клапан 1. Затем

газ, оставшийся в резервуаре, очищается.

2.2. Очистка и разделение:

1. Переносят CO_2, собранный в резервуаре, в первую криогенную ловушку с помощью жидкого азота в течение не менее 1 мин, затем откачивают неконденсированный газ до достижения давления менее 0,05 мбар.
2. Переносят образец CO_2 в измерительное устройство, используя жидкий азот во второй криогенной ловушке и заменив жидкий азот в первой криогенной ловушке на воду при температуре -80 ± 5 ºC. Поддерживают эту температуру в течение не менее 1 мин.
3. Откачивают неконденсированный газ (до достижения давления менее чем 0,05 мбар) перед закрытием измерительного устройства.
4. Pump the uncondensed gas (until a pressure of less than 0.05 mbar is reached) before closing the measurement device.

2.3. Измерение соотношения $^{13}C/^{12}C$

Соотношение изотопов углерода в полученном CO_2 измеряется с помощью IRMS с двойным входом.

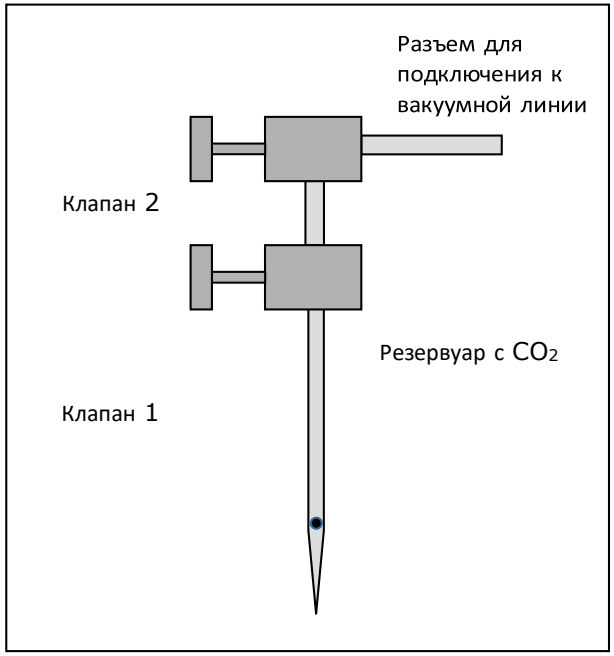
3. Библиографическая ссылка

Mesure du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du gaz carbonique des vins mousseux et des vins gazeifiés. J.Merín, S.Mínguez. Office International de la Vigne et du Vin, F.V. 1039, 2426/200297.

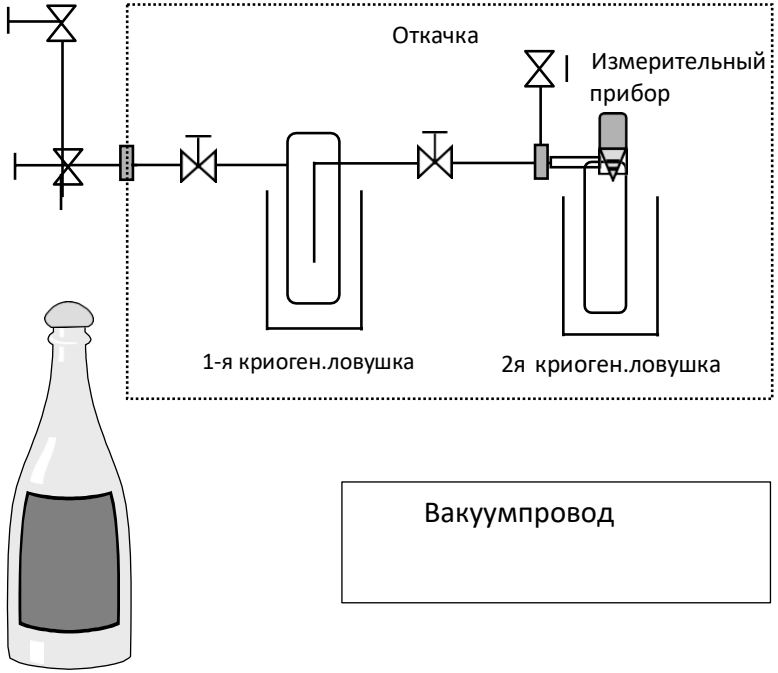
ПРИЛОЖЕНИЕ A

Схемы автономных систем

Устройство для отбора проб газа



Отбор газа и очистка CO_2



ПРИЛОЖЕНИЕ B

Экспериментальная процедура на основе он-лайн систем отбора и измерения проб (CF-IRMS)

1. Методика отбора проб

Сначала из системы отбора проб откачивается воздух, углекислый газ извлекается из бутылки с помощью "пробоотборника", и определенное количество переносится в емкость для хранения. После создания избыточного давления небольшое количество пробного газа вводится в поток гелия в режиме on-line с помощью дросселя. Система отбора проб показана на рисунке 2.

Теперь в потоке гелия (поток пробы) присутствует непрерывный поток углекислого газа. Оставшийся поток гелия свободен от диоксида углерода и выступает в качестве нулевого потока. Искусственные "пики переключения" создаются путем временного переключения с нулевого потока на поток пробы (время переключения: 2 секунды), которые измеряются в МС на предмет их изотопного соотношения.

2. Проведение исследования (см. рисунок):

2.1. Откачка в системе отбора проб

Вся система отбора проб откачивается до отрицательного давления 1 мбар (Вентиль 3 закрытый)

2.2. Отбор проб

Крышка прокалывается "пробоотборником", и газообразная среда бутылки переносится в сосуд для хранения газа (GV) посредством отрицательного давления (давление повышается примерно до 50 мбар). Клапан точной регулировки (VF) обеспечивает контролируемый и медленный перенос газа. Во время переноса газ очищается в криотраппе.

2.3. Подача

После отбора проб (Клапан 3, Клапан 2 закрыты, Клапан 4 открытый) с помощью гелия создается избыточное давление 1,5 бар. Измеряемый газ подается в CF-IRMS путем открытия Клапана 3. Измерение может быть выполнено после предварительного запуска в течение 150 секунд.

В качестве ограничителя встроен капилляр, который позволяет подавать только очень небольшое количество газа-носителя (10 мл/мин).

2.4. Измерения

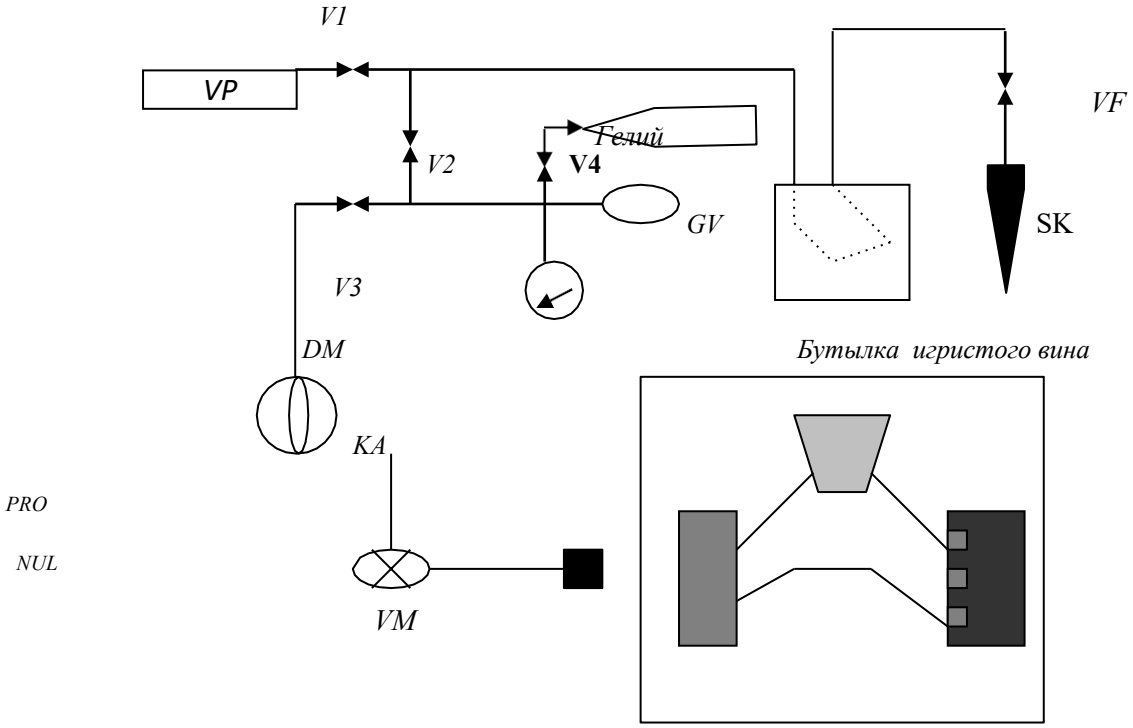
Поток углекислого газа теперь постоянно присутствует в потоке образцов гелия (PRO). Переключение с потока образца (PRO) на поток чистого гелия (NUL) позволяет генерировать пики искусственного переключения. Переключение в сторону образца: 2 секунды (нулевая сторона: 10-30 секунд).

1. Библиографическая ссылка

Examination of the $^{13}C/^{12}C$ isotopes in sparkling and semi-sparkling wine with the aid of simple on-line sampling.

M. Boner and H. Förstel. Office International de la Vigne et du Vin, FV 1152.

Схема он-лайн системы



V1-V4 обратный клапан

VP вакуумный насос
VF клапан тонкой регулировки
SK устройство для отбора проб
PRO поток пробы гелия (50 мл/мин)
NUL поток гелия (нулевой) (60 мл/мин)
KF ловушка для воды пропанол при 90ºC
GV 250 мл сосуд для хранения газа
DM Датчик давления
KA дроссельный капилляр (10 см, 150 мкм)
VM 2/4-ходовой клапан

ПРИЛОЖЕНИЕ C

Экспериментальная процедура на основе методики GC-C-IRMS

1. Характеристики прибора

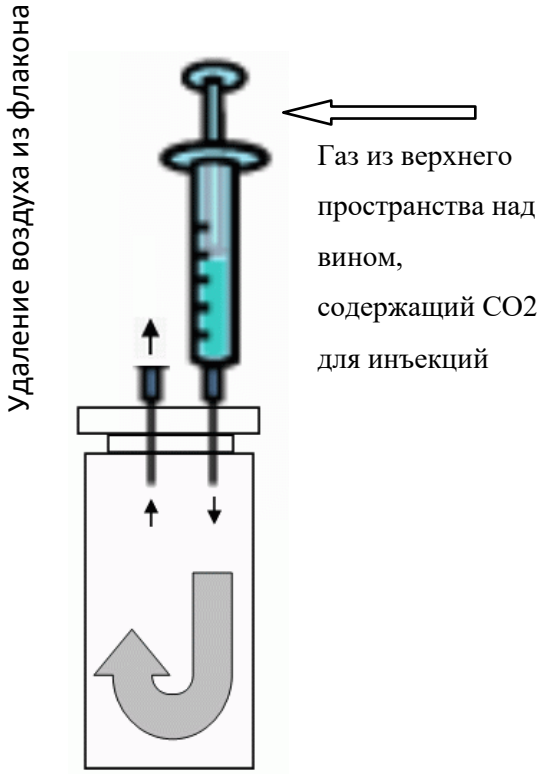
- Газовый хроматограф: GC Varian 3400
- Капиллярная колка: HP-INNOWax (сшитый полиэтиленгликоль), 30 м x 0,25 мм ID, толщина пленки 0,5 мкм
- Интерфейс горения ThermoFinnigan-MAT, с окислительной печью, установленной при 940°C или выключенной; редукционная печь при 640°C или выключенной
- Масс-спектрометр: DeltaPlus ThermoFinnigan-MAT.

2. Проведение исследования

2.1. Отбор проб CO_2:

1. Аликвоты газа набирались через 25-кубовый шприц, посредствам протыкания длинной железной иглой пробки. Давление CO_2 самопроизвольно заполняло шприц газовым пространством.
2. Переносят газ в обжатые пробирки для последующего анализа. Пробирки, используемые для хранения газа, предварительно обжимаются тефлон-силиконовыми пробками с перегородками. Чтобы выпустить воздух из флакона и, следовательно, атмосферный CO_2, в перегородку погружается вторая игла, гарантирующая, что газ из винного пузырька вытеснит воздух из флакона. См. рисунок ниже.

ПРИМЕЧАНИЕ: Чтобы убедиться в чистоте флакона, используется шприц большего объема, соответствующего объему флакона. В нашем случае для флакона объемом 2 мл используется шприц объемом 25 куб. см (или даже больше).

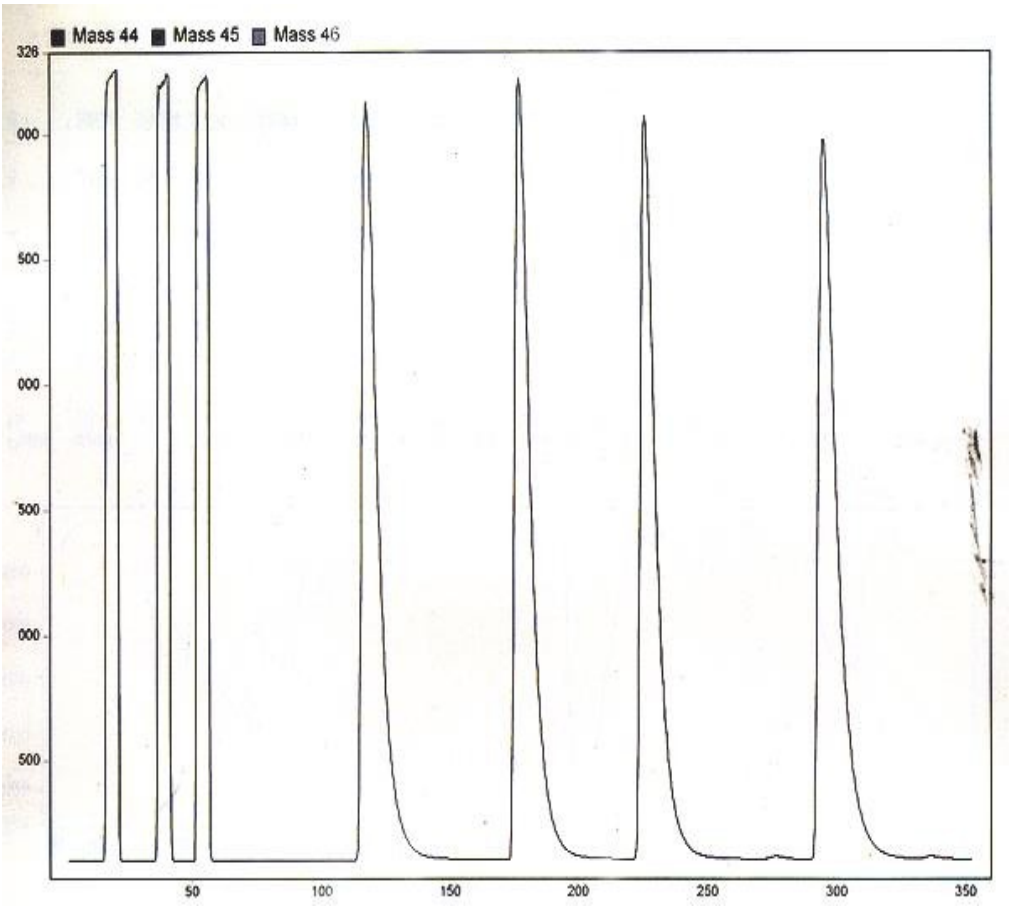


* Обращают внимание, что флакон не соответствует масштабу шприца.

2.2. Анализы GC-IRMS: инъекция CO_2 и измерение соотношения $^{13}C/^{12}C$

Несколько мкрл газа были непосредственно введены в колонку при помощи шприца Гамильтона с впаянной иглой объемом 10 мкрл. Были установлены раздельные условия высокого потока. Гелий-носитель находился под давлением 20 psi.

В каждом цикле для каждого образца выполнялось 4 инъекции. Общее время анализа составило 6 минут. См. хроматограмму ниже.



2.3. Обработка результатов

Программное обеспечение, используемое для записи и обработки сигналов с масс-спектрометра, было версией 1.50 Isodat NT, от ThermoFinnigan-MAT, работающей под MS-Windows NT OS.

Для каждого образца среднее значение $\delta^{13}C$ рассчитывается как среднее значение последних 3 инъекций. Значение $\delta^{13}C$ первой инъекции систематически отбрасывается.

ПРИЛОЖЕНИЕ D

(содержащее полезные сведения)

Статистические результаты межлабораторного исследования

В соответствии со стандартом ISO 5725:1994 в ходе межлабораторного испытания, проведенного 11 европейскими лабораториями и мексиканской лабораторией, были определены следующие параметры.

Год проведения межлабораторных испытаний 2003-2004
Количество лабораторий 12
Количество образцов 5 в слепых двойных
Параметры

$\delta^{13}C$ из CO_2

Идентификация образца	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
Количество участвующих лабораторий	12	12	12	12	12
Количество оставшихся лабораторий, после исключения выбросов	12	11	12	12	12
Количество повторений на лабораторию	2	2	2	2	2
Количество принятых результатов испытаний	24	22	24	24	24
Среднее значение ($\delta^{13}C$) ‰	-9.92	-20.84	-23.66	-34.80	-36.43
s_{r2}	0.057	0.031	0.119	0.006	0.044
Повторяемость стандартного отклонения (S_r) ‰	0.24	0.18	0.35	0.08	0.21
Значение повторяемости, r (2.8 x S_r) ‰	0.67	0.49	0.97	0.21	0.58
S_{R^2}	0.284	0.301	0.256	0.140	0.172
Стандартное отклонение	0.53	0.55	0.51	0.37	0.41

воспроизводимости (S_R) ‰					
Значение воспроизводимости, R (2.8 x S_R) ‰	1.49	1.54	1.42	1.05	1.16

Типы образцов:
A Игристое вино - C_4 сахар
B Игристое вино - C_3 сахар
C Игристое вино - C_3 сахар
D Газифицированное вино
E Газифицированное вино

ПРИЛОЖЕНИЕ E

Статистические результаты межлабораторного испытания игристых и газифицированных винах
Процедуры отбора проб 7.1.d и 7.1.e

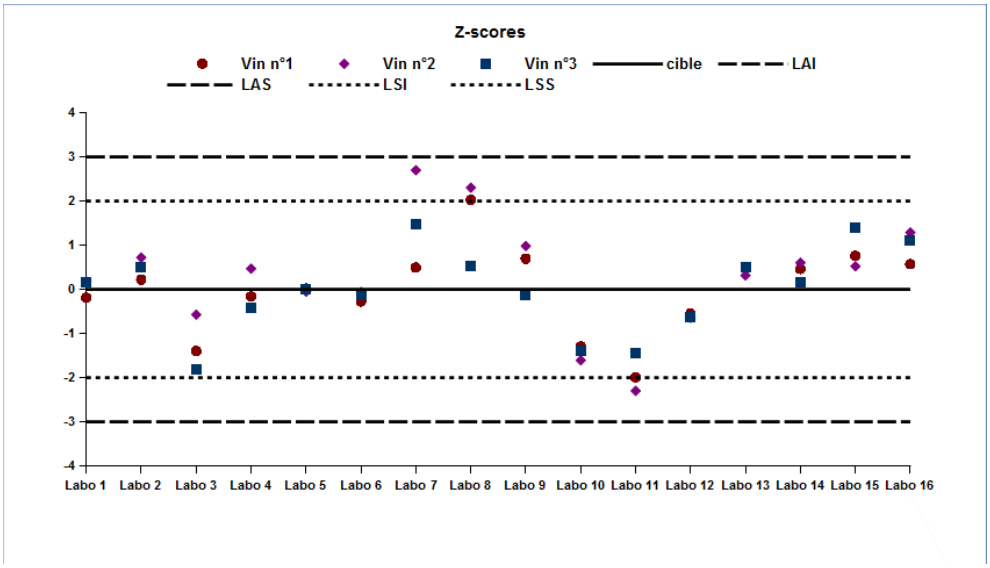
В соответствии с методом **OIV-MA-AS1-09: R2000**, следующие параметры были определены в рамках межлабораторного испытания, проведенного с участием 16 лабораторий.

Год проведения межлабораторных испытаний: 2003-2004
Количество лабораторий: 16
Тип образцов: Игристые и газифицированные вина
Количество образцов: 3, двойных слепых
Измеряемый параметр: $\delta^{13}C$

ПОКАЗАТЕЛИ	**ВИНО № 1**	**ВИНО № 2**	**ВИНО № 3**
Количество лабораторий	16	14	16
Количество повторений	2	2	2
Минимум	-32.90	-33.10	-23.64
Максимум	-29.83	-30.97	-20.57
Дисперсия повторяемости sr^2	0.0467	0.0118	0.0648
Межгрупповая дисперсия sL^2	0.43853	0,29762	0.51616
Дисперсия воспроизводимости sR^2	0.4852	0.3094	0.5810
Общее среднее значение	-31.42	-31.83	-22.15
Стандартное отклонение	0.22	0.11	0.25

воспроизводимости			
Предел r	0.612	0.307	0.720
Стандартное отклонение воспроизводимости	0.70	0.56	0.76
Предел R	1.971	1.574	2.157

Код Лаборатории	A	B	A	B	A	B	Вино № 1	Вино № 2	Вино № 3
Лаб 1	-31.40	-31.69	-31.56	-31.88	-21.93	-22.12	-0.18	-0.19	0.16
Лаб 2	-31.23	-31.29	-31.43	-31.41	-21.46	-22.04	0.23	-0.73	0.52
Лаб 3	-32.65	-32.12	-32.15	-32.13	-23.41	-23.64	-1.39	-0.56	-1.81
Лаб 4	-31.55	-31.50	-31.46	-31.66	-22.40	-22.54	-0.15	0.48	-0.42
Лаб 5	-31.50	-31.30	-31.80	-31.90	-22.00	-22.30	0.03	-0.04	0.00
Лаб 6	-31.46	-31.75	-31.96	-31.75	-22.39	-22.10	-0.27	-0.05	-0.13
Лаб 7	-31.48	-30.66	-31.29	-29.35	-21.47	-20.57	0.50	2.71	1.48
Лаб 8	-29.83	-30.17	-29.73	-31.35	-21.50	-21.96	2.04	2.31	0.55
Лаб 9	-30.96	-30.90	-31.34	-31.21	-22.22	-22.27	0.70	0.99	-0.13
Лаб 10	-32.34	-32.29	-32.68	-32.75	-23.25	-23.14	-1.29	-1.60	-1.37
Лаб 11	-32.90	-32.70	-33.10	-33.10	-23.00	-23.50	-1.98	-2.29	-1.45
Лаб 12	-31.91	-31.68	-32.22	-32.14	-22.58	-22.66	-0.54	-0.63	-0.62
Лаб 13	-31.03	-31.10	-31.61	-31.68	-21.78	-21.74	0.51	0.33	0.51
Лаб 14	-31.25	-30.93	-31.43	-31.54	-22.01	-22.02	0.57	0.62	0.17
Лаб 15	-30.89	-30.88	-31.59	-31.47	-21.08	-21.07	0.76	0.53	1.41
Лаб 16	-31.05	-30.98	-31.24	-30.97	- 21.090	-21.490	0.58	1.30	1.13



Библиография

1. Ana I. Cabañero, Tamar San-Hipólito and Mercedes Rupérez, GasBench/isotope ratio mass spectrometry: a carbon isotope approach to detect exogenous CO2 in sparkling drinks Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21: 3323–3328.

2. Laetitia Gaillard, Francois Guyon /, Marie-Hélène Salagoïty, Bernard Médina, Authenticity of carbon dioxide bubbles in French ciders through multiflow-isotope ratio mass spectrometry measurements. Food Chemistry. 2013, 141: 2103–2107

Метод OIV-MA-AS314-04 Метод II типа

Определение углекислого газа в вине манометрическим методом

Для предельных концентраций от 0,5 г/л до 7 г/л

(Резолюция Oeno 2/2006)

1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Углекислый газ в образце связывают 10 М гидроксидом натрия. Колбу Эрленмейера с боковым штифом подсоединяют к манометру и выпускают углекислый газ с серной кислотой из подготовленного образца. В результате измеряется повышение давления, что позволяет количественно определить содержание углекислого газа.

2. РЕАГЕНТЫ

2.1. Свежедистиллированная или деионизированная вода;
2.2. Гидроксид натрия (чистота >98%);
2.3. Серная кислота (чистота >95-97%);
2.4. Карбонат натрия безводный (чистота >99%).

Приготовление реагентов

2.5. 10 М гидроксид натрия: растворяют 100 г гидроксида натрия (2.2) в 200 мл воды (2.1) и доводят объем до 250 мл в объемной колбе.

2.6. Серная кислота, около 50% (об/об): осторожно добавляют концентрированную серную кислоту (2.3) к равному объему воды (2.1). Хорошо перемешивают при помощи мешалки. Охлаждают до комнатной температуры.

2.7. Стандартный раствор диоксида углерода 10 г/л: высушивают безводный карбонат натрия (2.4) в печи при температуре 260°C-270°C в течение 1 ночи и охлаждают до комнатной температуры в десикаторе. Растворяют 6,021 г сухого карбоната натрия в воде (2.1) и доводят объем до 250 мл в объемной колбе.

2.8. Калибровочные растворы диоксида углерода 0,4; 1; 2; 4 и 6 г/л: пипетками отбирают 2, 5, 10, 20 и 30 мл стандартного раствора (2.7) в отдельные 50 мл объемные колбы и доводят до 50 мл водой (2.1).

3. АППАРАТУРА

3.1. Волюметрические колбы объемом 250 мл и 50 мл;
3.2. Печь;
3.3. Десикатор;
3.4. Весы с точностью до 0,1 мг;
3.5. Холодильник или водно-этиленгликолевая баня, -4ºC;
3.6. Электронный плотномер или пикнометр и термостатическая водяная баня, 20ºC;
3.7. Пипетки 0,5, 2, 3, 5, 10, 20 и 30 мл;
3.8. Конусообразная пробирка объемом 100 мл из шлифованного стекла с широким горлом;
3.9.Цифровой манометр (позволяет измерять давление до 200 кПа с точностью до 0,1 кПа);
3.10.Реакционная колба: колба Эрленмейера на 25 мл с боковым штифом на 3 мл и трехходовым клапаном (см. рис. 1);
3.11. Вакуумная система (т.е. водяной отсасывающий насос).
3.12 Делительная воронка

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Подготовка образцов

Готовят образец в двух экземплярах. Охлаждают образец в холодильнике в течение ночи или в водно-этиленгликолевой ванне при температуре - 4ºC в течение 40 мин. Помещают 3 мл 10 М раствора гидроксида натрия (2.5) в конусообразную пробирку емкостью 100 мл. Взвешивают колбу с содержимым с точностью до 0,1 мг. Наливают примерно 75 мл охлажденного образца в конусообразную пробирку, содержащую раствор гидроксида натрия. Взвешивают колбу с содержимым с точностью до 0,1 мг. Перемешивают и дают нагреться до комнатной температуры.

4.2. Определение содержания углекислого газа

Переносят 2 мл подготовленного образца (4.1) в реакционную колбу. Соединяют колбу с манометром через открытый трехходовой клапан. Пипетируют 0,5 мл 50% серной кислоты (2.6) в боковой штиф. Закрепляют трехходовой клапан и пробку бокового штифа зажимами. Отмечают давление воздуха. Закрывают трехходовой клапан. Перемешивают содержимое путем наклона и энергичного встряхивания. Учитывают давление. Подготовленный образец можно разбавить при необходимости водой.

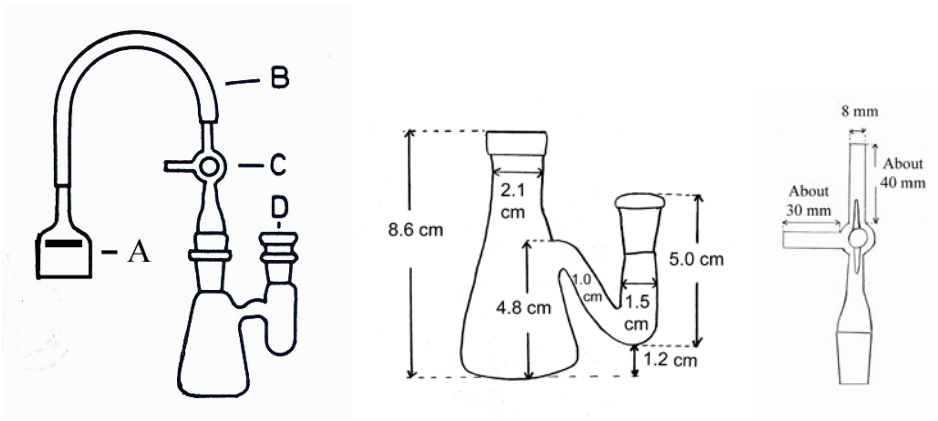


Рис.1 Аппаратура. A-Манометр, B-резиновый шланг, C-трехходовой клапан, D-реакционная колба (слева) и приблизительные размеры стеклянной посуды (в центре и справа).

4.3. Калибровка

Определяют содержание углекислого газа в калибровочных растворах, как описано выше (4.2). Измеряют три калибровочных раствора, которые находятся в пределах ожидаемого диапазона концентраций образца. Калибровочные растворы измеряются в двух экземплярах

4.4. Измерение плотности образца

Удаляют углекислый газ из образца путем встряхивания образца сначала в делительной воронке, а затем в течение 3 мин в вакууме, создаваемом водо-отсасывающим насосом. Измеряют плотность образца с помощью

электронного плотномера или пикнометра.

5. РАСЧЕТЫ

Рассчитывают повышение давления, вызванное углекислым газом, выделяемым из каждого калибровочного раствора, и строят график калибровки.
Рассчитывают наклон (a) и смещение (b) калибровочного графика.

Объем V (мл) подготовленного образца:

$$V = [(m2-m1) \times 1000]/d \quad (1),$$

где
m1 (г)= масса (колба + 3 мл NaOH);
m2 (г) = масса (колба + 3 мл NaOH + образец);
d (кг/м^3) = плотность образца.

Повышение давления p_i, вызванное выделением углекислого газа из подготовленного образца:

$$pi = ps - pap \quad (2),$$

где
p_s = показания манометра после высвобождения углекислого газа из образца
p_{ap} = показания манометра до добавления H_2SO_4 (т.е. давление воздуха)

Концентрация двуокиси углерода, C, в образце (г/л) определяется формулой:

$$C = [(pi - b) / a] \times [(V + 3)/V] \times L \quad (3),$$

где
p_i = повышение давления (уравнение 2)
a = наклон калибровочного графика
b = смещение калибровочного графика
V = объем пробы (уравнение 1)
L = коэффициент разбавления для случая если образец разбавлен после подготовки проб

Содержание диоксида углерода в % по массе:

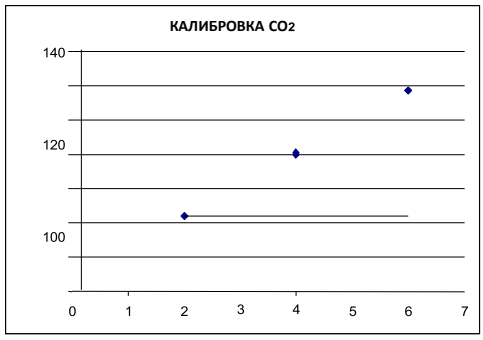
$CO2\ \%\ (об/об) = C \times 100/d$ (4)

Пример расчета содержания углекислого газа:

Калибровка

Концетрация STD г/л	Атмосферное давление мбар	Давление std мбар	Повышение давления мбар
2	1021	1065	44
2	1021	1065	44
4	1021	1101	80

наклон	18.25000
точка пересеч.	7.50000



Расчет содержания CO_2

ОБРАЗЕЦ	Плотность d (кг/ м3)	Колба + NaOH m1 (г)	Колба NaO+ образец m2 (г)	Атмосферное давление P_{ap} (**мбар**)	Давление образца P_s (**мбар**)	P_s-P_{ap}	Образец V (мл)	Образец V (мл)	Среднее значение **CO2 г/л**
Игристое вино 1	d (кг/ м3)	NaOH	156.162	1021	1112	91	69.64	**4.77**	
Игристое вино 1	1027.2	m1 (г)	156.162	1021	1113	92	69.64	**4.83**	**4.80**
Игристое вино 2	1025.3	86.1066	153.4407	1021	1118	97	65.67	**5.13**	
Игристое вино 2	1025.3	86.1066	153.4407	1021	1118	97	65.67	**5.13**	**5.13**

6. ДОСТОВЕРНОСТЬ

6.1. Критерии эффективности

- Стандартное отклонение, рассчитанное от дубликатов, s_o = 0.07 г/л
- Относительное стандартное отклонение, RSD = 1.9%
- Повторяемость, r = 5.6 %
- Расширенная неопределенность измерений (k = 2), U = 3.8%
- Диапазон значений 0.4-6 г/л
- Область определения 0,3 -12 г/л (образцы с концентрацией выше 6 г/л следует разбавлять водой 1:2 в соответствии с пределом калибровки)
- Предел обнаружения 0,14 г/л
- Предел количественной оценки 0,48 г/л

Приложение А Литература

European Brewery Convention Analytica-EBC, Fourth edition, 1987, 9.15 Carbon dioxide. / Европейская пивоваренная конвенция Analytica-EBC, четвертое издание, 1987 год, 9.15 Углекислый газ.

OIV, SCMA 2002, FV N° 1153, determination of carbon dioxide in alcoholic beverages by a modified EBC method / OIV, SCMA 2002, FV N° 1153, определение диоксида углерода в алкогольных напитках модифицированным методом EBC

OIV, SCMA 2004, FV N° 1192, determination of carbon dioxide in alcoholic Beverages by a modified EBC method, Statistical results of the collaborative study / OIV, SCMA 2004, FV N° 1192, определение углекислого газа в алкогольных напитках модифицированным методом EBC, Статистические результаты совместного исследования

OIV, SCMA 2005, FV N° 1222, comparison of the titrimetric method and the modified EBC method for the determination of carbon dioxide in alcoholic beverages / OIV, SCMA 2005, FV N° 1222, сравнение титриметрического метода и модифицированного метода EBC для определения диоксида углерода в алкогольных напитках

Ali-Mattila, E. and Lehtonen, P., Determination of carbon dioxide in alcoholic beverages by a modified EBC method, Mitteilungen Klosterneuburg 52 (2002): 233-236 / Ali-Mattila, E. and Lehtonen, P., Определение углекислого газа в алкогольных напитках модифицированным методом EBC, Mitteilungen Klosterneuburg 52 (2002): 233-236

Приложение B

Статистические результаты совместного исследования

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИОКСИДА УГЛЕРОДА В АЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКАХ МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ EBC

1. Цель исследования

Целью исследования было определение повторяемости и воспроизводимости модифицированного метода EBC для определения углекислого газа в винах, игристых винах, сидрах и пиве.

2. Задачи исследования

В результате ферментации в алкогольных напитках образуется углекислый газ. При производстве игристых вин углекислый газ является одним из самых необходимых продуктов, его также можно добавлять в некоторые алкогольные напитки. Углекислый газ изменяет вкус и аромат и является консервантом в алкогольных напитках.

В соответствии с определениями Международного кодекса энологической практики, игристое вино должно иметь избыточное давление не менее 3 бар за счет углекислого газа в растворе, когда оно хранится при температуре 20°C в закрытых емкостях. Соответственно, полуигристое вино должно иметь избыточное давление не менее 1 бар и не более 2,5 бар. Избыточное давление в 3 бар, 2,5 бар и 1 бар соответствует при температуре 20°C примерно 5,83 г/л, 5,17 г/л и 3,08 г/л диоксида углерода в растворе, соответственно.

В настоящее время не существует практичного и надежного метода определения углекислого газа в алкогольных напитках. Большой разброс результатов по определению углекислого газа в международных квалификационных тестах является четким свидетельством того, что существует необходимость в разработке надежного метода.

3. Область применения и актуальность

Предлагаемый метод является количественным и применим для определения углекислого газа в алкогольных напитках. Данный метод был подтвержден в совместном исследовании по определению углекислого газа в вине, пиве, сидре и игристом вине с помощью анализов на уровнях, варьирующихся примерно от 0,4 г/л до 12 г/л (Примечание: фактический уровень калибровки колеблется от 0,4 г/л до 6 г/л. В случае, если содержание углекислого газа превышает 6 г/л, образцы следует разбавить водой до этого уровня).

4. Материалы и матрицы

Совместное исследование проводилось на 6-ти различных образцах. Все образцы, кроме пива, были отправлены в слепом повторении, поэтому в общей сложности участникам было роздано 12 бутылок: две пива, две сидра, две красных вина, две белых вина, две жемчужных вина и две игристых вина. Каждая бутылка кодировалась индивидуально для каждого участника. Все образцы были доставлены в оригинальных бутылках, этикетки были удалены со всех образцов, кроме образцов игристого вина.

Измерение количества углекислого газа в 10 бутылках с одинаковым номером партии позволило проверить однородность образцов.

5. Пробные образцы

Четыре контрольных образца были отправлены участникам для ознакомления с методом. Эти образцы включали одно пиво, одно вино, одно жемчужное вино и один образец игристого вина.

6. Используемый метод и вспомогательные материалы

Методика и таблица Excel для подсчета результатов были разосланы участникам.

Также были предоставлены вспомогательные документы, включая сопроводительное письмо, форму бланка для образцов и таблицы результатов.

7. Анализ данных

4.1. Определение выбросов оценивалось с помощью теста Кохрана, одностороннего теста Граббса и двустороннего теста Граббса.

4.2. Проводился статистический анализ для получения данных о повторяемости и воспроизводимости.

8. Участники

В совместном исследовании приняли участие девять лабораторий в разных странах. Лабораториям были присвоены лабораторные коды. Лаборатории-участники имеют проверенный опыт анализа алкогольных напитков.

Norway

Bundesamt für Weinbau
Gölbeszeile 1
A-7000 Eisenstadt
Austria

Comité Interprofessionnel du
Vin de Champagne
5, rue Henri MARTIN
BP 135
51204 EPERNAY CEDEX
France

High-Tec Foods Ltd
Ruomelantie 12 B
02210 Espoo
Finland

Institut für Radioagronomie
Forschungszentrum
Jülich GMBH
Postfach 1913
52425 JÜLICH
Germany

Systembolagets laboratorioum
Armaturvägen 4,
S-136 50 HANINGE
Sweden

9. Результаты

Однородность образцов определяли путем измерения содержания углекислого газа в 10 бутылках с одинаковым номером партии в Alcohol Control Laboratory (Финляндия). Участникам были отправлены образцы с соответствующими номерами партий:

CO_2 г/л	Пиво 1	Пиво 2	Сидр	Белое вино	Красное вино	Жемч. вино	Игристое вино
Ср. знач	5.191	5.140	4.817	1.337	0.595	5.254	7.463
s	0.020	0.027	0.025	0.036	0.038	0.022	0.046

Согласно тесту на однородность, содержание CO_2 в двух сортах пива было одинаковым, и поэтому они считались слепыми дубликатами.

Отдельные результаты для всех образцов и лабораторий совместного исследования приведены ниже.

Код лаб.	Пиво 1	Пиво 2	Сидр 1	Сидр 2	Белое вино 1	Белое вино 2	Крас. вино 1	Крас. вино 2	Жемч. вино 1	Жемч. вино 2	Игрист. вино 1	Игрист. вино 2
A	5,39	5,08	4,75	4,91	1,25	1,11	0,54	0,54	5,15	5,22	6,93	6,91
B	4,76	5,53	4,71	4,70	1,90[3]	1,78[3]	0,73[2]	1,19[2]	5,85[3]	5,93[3]	7,66[3]	7,72[3]
C	5,15	5,14	4,93	4,94	1,36	1,41	0,51	0,48	5,23	5,33	7,33	7,36
D	3,13[1]	3,95[1]	4,36[1]	0,38[1]	1,11[1]	1,11[1]	0,43[1]	0,38[1]	4,47[1]	4,29[1]	5,54[1]	5,52[1]
E	4,87	4,73	4,96	4,78	1,52	1,52	0,78[3]	0,80[3]	4,98	4,94	5,83	6,17
F	5.34	4.91	4.71	5.01	1.33	1.40	0.46	0.57	5.22	4.95	6.52	6.67
G	5,18	5,15	4,82	4,86	1,37	1,36	0,56	0,59	5,22	5,27	7,54	7,47
H	5,42	5,40	5,05	5,12	1,15	1,30	0,52	0,53	5,12	5,10	7,25	7,34
I	5,14	5,13	4,65	4,76	1,16	1,19	0,47	0,61	5,16	5,06	6,88	6,48

1. Удалено из-за большой систематической ошибки, очевидно, из-за плохой калибровки
2. Выброс по тесту Кохрана
3. Выброс по тесту Граббса

Статистические результаты совместного исследования кратко излагаются ниже.

	Пиво	Сидр	Белое вино	Крас вино	Жем вино	Игристое вино
Среднее (г/л)	5.145	4.859	1.316	0.532	5.139	6.906
Средн. повт. 1 (г/л)	5.156	4.833	1.306	0.510	5.154	6.897
Средн. повт. 2 (г/л)	5.134	4.885	1.327	0.553	5.124	6.914
s_r (г/л)	0.237	0.089	0.060	0.053	0.086	0.149
s_R (г/л)	0.237	0.139	0.135	0.059	0.124	0.538
SDR_r (%)	4.597	1.821	4.562	9.953	1.663	2.163
RSD_R (%)	4.611	2.855	10.22	11.07	2.407	7.795
r ($2,8*s_r$) (г/л)	0.662	0.248	0.168	0.148	0.239	0.418
R ($2,8*s_R$) (г/л)	0.664	0.388	0.377	0.165	0.346	1.507
Индекс воспроизводимости Горвица R	1.043	0.640	1.883	1.779	0.544	1.843

Выводы

Значения коэффициента Горвица < 2 указывают на приемлемость метода. Однако значения коэффициента Горвица немного высоковаты. В пяти из девяти участвующих лабораторий такие испытания раньше не проводились. Поэтому результаты можно считать по меньшей мере очень удовлетворительными. Метод дает результаты в г/л, но результаты могут быть преобразованы в единицы давления. [1 См.]

1. Troost, G. and Haushofer, H., Sekt, Schaum- und Perlwein, Eugen Ulmer Gmbh & Co., 1980, Klosterneuburg am Rhein, ISBN 3-8001-5804-3,

Схема 1 на странице 13.

Приложение C

Валидация при низком уровне углекислого газа

1. Предел обнаружения и определения

Образец белого вина анализировался в двух экземплярах десять раз. Статистические данные были следующими:

Повторений	10
Среднее значение CO_2 (г/л)	0.41
Стандартное отклонение среднего значения, s (г/л)	0.048
Предел обнаружения 3 × s	0.14
Предел определения 6 × s	0.48

2. Стандартные добавки

Стандартные добавки в пяти различных концентрациях в дубликатах были внесены в одно и то же вино, которое использовалось для установления пределов обнаружения и определения. Соответствующие концентрации CO_2 также добавляли в воду. Сравнивались линейные регрессии этих двух экспериментов.

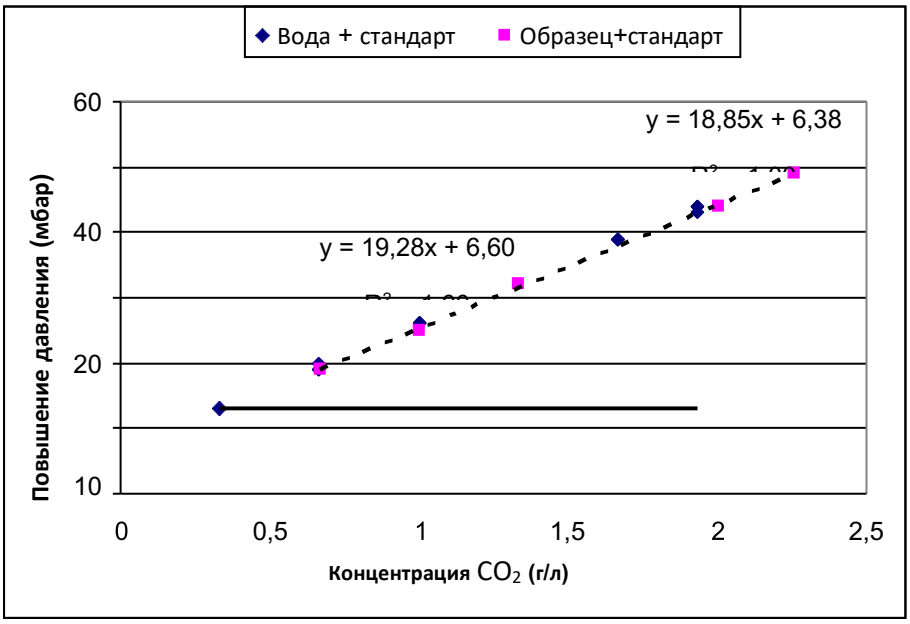


Рис.1 Стандартные добавки к образцу и к воде.

Статистические данные
участков:

	Вода+ стандарт	Образец+стандарт
Наклон	19.3	18.9
Неопределенность уклона	0.3	0.3
Перехват	6.6	6.4
Неопределенность перехвата	0.4	0.5
Остаточное стандартное отклонение	0.4	0.3
Количество образцов	15	10

Согласно статистическим данным, две линии регрессии похожи.

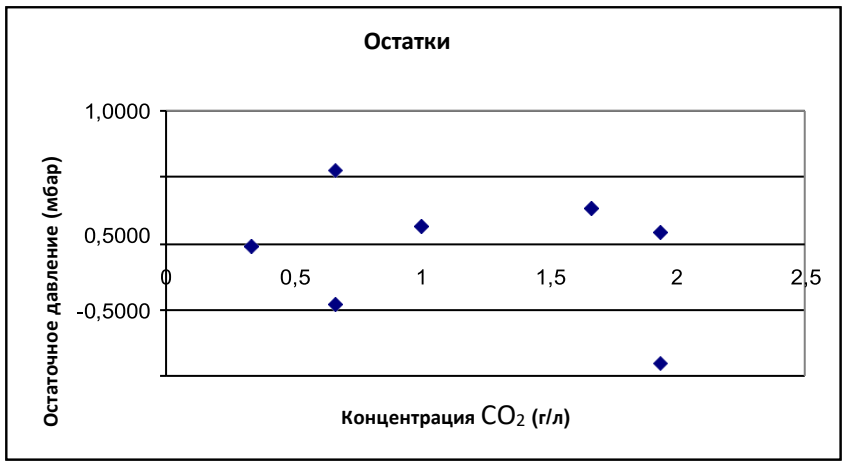


Рисунок 2. Остатки уравнения «вода+стандарты»
Остатки находятся по обе стороны от нуля, что указывает на то, что линия регрессии является линейной.

Приложение D
Сравнение с другими методиками и лабораториями

1. Сравнение модифицированного метода EBC с коммерческим прибором Anton Paar CarboQC

Образец	**Модифицированный EBC метод** (г/л)	**Антон Паар CarboQC** (г/л)	**Разница**
Игристое вино	9.14	9.35	-0.21
Сидр	4,20	4,10	0.1
Белое вино	1,18	1,10	0.08
Красное вино	1,08	0,83	0.25
Пиво 1	5,26	5,15	0.11
Пиво 2	4,89	4,82	0.07
Пиво 3	4,90	4,92	-0.02
Безалкогольное пиво 1	5,41	5,33	0.08
Безалкогольное пиво 2	5,39	5,36	0.03
			Среднее значение 0.06

По данным t-теста систематического расхождения в измерениях нет.

2. Сравнение между анализами Bfr, Германия и ACL, Финляндия

Лаборатория Bfr отправила четыре образца в лабораторию ACL, а ACL отправила пять образцов в Bfr.
Эти девять образцов были проанализированы независимо друг от друга - в ACL по методу, представленному в данной работе, и в Германии в Bfr с использованием титриметрического метода.
Статистические данные о результатах были следующими:

Среднее значение разницы	0.14 г/л
Стандартное отклонение	0.13 г/л
Z- показатель	1.04

Представленный здесь метод и титриметрический метод были также сравнены австрийской организацией Bundesamt für Weinbau с использованием 21 собственного образца.
Статистические данные были следующими:

Среднее значение разницы	-0.01 г/л
Стандартное отклонение	0.26 г/л
Z- показатель	-0.03

Заключение

Согласно данной работе, а также более ранним экспериментам, этот метод является универсальным.
Он подходит для определения содержания углекислого газа во всех видах алкогольных напитков, как например, в пиве, винах, фруктовых винах, сидрах, жемчужных винах и игристых винах с уровнем концентрации 0,3 г/л и выше.

(Все права защищены) Согласно законодательству, МОВВ снимает с себя любую ответственность за непроизвольные ошибки или упущения, которые могут произойти, несмотря на внимательность, проявленную при редактировании. Воспроизведение текстов, опубликованных в данном издании, запрещено. Данные тексты являются собственностью МОВВ, которая имеет исключительное право воспроизводить и переводить данные тексты по всему миру. Закон запрещает копирование и воспроизведение для группового использования. Любое представление или воспроизведение, полное или частичное, любыми способами, без согласия МОВВ, является незаконным действием и представляет собой нарушение авторских прав.

© OIV – 2022

Напечатано в Париже
(Франция)

35, улица Монсо

75008 Париж, Франция

Обязательный экземпляр: Август 2021

ISBN : 978-2-85038-127-0
том I и II ISBN : 978-2-85038-128-7 том I
и 978-22-85038-129-4 том II

МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВИНОГРАДАРСТВА И ВИНОДЕЛИЯ
35, Улица Монсо
75008 ПАРИЖ
Тел. (33) 01.44.94.80.80 - Тел. (33) 01.42.66.90.63

E-mail: oiv@oiv.int - www.oiv.int

Международная организация виноградарства и виноделия

Сборник международных методов анализа вин и сусел

ИЗДАНИЕ 2022 ***<u>ТОМ 2</u>***

ВКЛЮЧАЕТ :
Резолюции, принятые 19 Генеральной Ассамблеей 6 июля 2021 года в Париже (Франция)

МОВВ - 35 ул. Монсо Париж

Издано в Париже (Франция)
35, ул. Монсо
75008 Париж, Франция Обязательный
экземпляр: Август
2022 ISBN : 978-2-85038-127-0
ISBN ТОМ II : 978-22-85038-129-4

Метод OIV-MA-AS315-01 Метод IV типа

Ацетальдегид

(Резолюция Oeno 377/2009)

1.Сущность метода

Ацетальдегид (этаналь) в вине, обесцвеченном с помощью угля, вступает в реакцию с нитропруссидным натрием и пиперидином, вызывая изменение цвета с зеленого до фиолетового, чья интенсивность оценивается в 570 нм.

2.Используемое оборудование

Спектрофотометр, позволяющий производить измерения спектрального коэффициента поглощения при длине волны 570 нм с использованием 1 см оптической кюветы.

3.Реактивы

3.1 Раствор пиперидина, ($C_5H_{11}N$) 10% (об./об.).

Готовят прямо перед использованием, смешивая 2 мл пиперидина с 18 мл дистиллированной воды.

3.2 Раствор нитропруссидного натрия, 0.4% (масс./об.).

В 250 мл стеклянной мерной колбе растворяют 1 г порошкообразного нитропруссидного натрия, Na_2 $[Fe(CN)_5NO].2H_2O$ в дистиллированной воде, доведя до нужного объема.

3.3Активированный уголь

3.4 Разбавленная соляная кислота, 25% (об./об.)

3.5 Щелочной раствор

Растворяют 8.75 г борной кислоты в 400 мл растворе гидроксида натрия, 1 моль/л. Доводят объем раствора до 1 литра, добавив дистиллированной воды.

4. Проведение исследования

4.1 *Образец*

Наливают примерно 25 мл вина в 100 мл колбу Эрленмейера, добавляют 2 г активированного угля. Несколько секунд усиленно встряхивают, затем дают отстояться в течение двух минут и фильтруют через рифленый медленнодействующий фильтр для получения прозрачного фильтрата. Помещают 2 мл прозрачного фильтрата в 100 мл колбу Эрленмейера, добавляют, встряхивая колбу, 5 мл раствора нитропруссидного натрия (3.2) и 5 мл раствора пиперидина (3.1). Смешивают и сразу после этого помещают раствор в 1-сантиметровую оптическую кювету. Получившейся оттенок, который может варьироваться от зеленого до фиолетового, измеряют спектрофотометром в видимой области с длиной волны в 570 нм. Изменение цвета сначала происходит интенсивно, а затем цвет быстро возвращается к первоначальному оттенку; необходимо без промедления измерить и зафиксировать максимальное значение спектрального коэффициента поглощения, которое наступает примерно через 50 секунд. Концентрация ацетальдегида в анализируемой жидкости определяется при помощи калибровочной кривой.

Примечание: если анализируемая жидкость содержит излишки свободного ацетальдегида, то перед тем, как начать процесс определения ацетальдегида, необходимо сначала смешать его с диоксидом серы. Для этого необходимо добавить небольшое количество свободного диоксида серы SO_2 в порцию жидкости, которую предстоит анализировать и ждут час перед тем, как начать процесс.

4.2. *Подготовка калибровочной кривой*

4.2.1 Раствор ацетальдегида, смешанный с диоксидом серы

Готовят 5-6% (*масс./об.*) раствор диоксида серы и определяют его концентрацию с помощью титрования раствором йода 0.05М.

В стеклянную мерную колбу объемом 1 литр добавляют вышеуказанный раствор, по объему равный 1500 мг диоксида серы. Затем добавляют в колбу примерно 1 мл недавно полученного и охлажденного дистиллята ацетальдегида. Доливают дистиллированной воды, доведя объем раствора до 1 литра. Смешивают и оставляют настояться на ночь.

Точная концентрация данного раствора определяется следующим образом:

Помещают в 500 мл колбу Эрленмейера 50 мл исходного раствора; добавляют 20 мл разбавленной соляной кислоты (3.4) и 100 мл воды. Титруют свободный диоксид серы, используя йодный раствор

(0.05M) и крахмал в качестве индикатора, а бледно-голубой цвет для определения достижения конечной точки титрования. Добавляют 100 мл щелочного раствора и голубоватый оттенок исчезнет. Титруют раствор диоксида серы и ацетальдегида с помощью йодного раствора (0.05M) до достижения бледно-голубого оттенка (конечной точки титрования): пусть *n* будет используемым объемом. Раствор ацетальдегида и диоксида серы содержит 44.05 *n* мг ацетальдегида на литр.

4.2.2 Подготовка калибровочных стандартов

В пять стеклянных мерных колб объемом 100 мл каждая добавляют соответственно 5, 10, 15, 20 и 25 исходного раствора. Доводят до нужного объема за счет добавления дистиллированной воды. Данные растворы соответствуют концентратам ацетальдегида в 40, 60, 120, 160 и 200 мг/л. Точная концентрация этих разбавленных растворов должна быть рассчитана с учетом концентрации ацетальдегида в базовом растворе (4.2.1), определённой ранее.

Далее необходимо определить концентрацию ацетальдегида на 2 мл в каждом из разбавленных растворов методом, описанным в пункте 4.1 График зависимости оптической плотности этих растворов от содержания ацетальдегида представляет собой прямую линию, не проходящую через начало координат.

БИБЛИОГРАФИЯ

REBELEIN H., *Dtsch. Lebensmit. Rdsch.,* 1970, **66,** 5-6.

Метод OIV-MA-AS315-02A Метод IV типа

Этилацетат

1. Сущность метода

Этилацетат определяют методом газовой хроматографии винного дистиллята с использованием внутреннего стандарта.

2. Методика

2.1 *Используемое оборудование* (смотреть главу *Летучая кислотность*).

2.2 *Проведение исследования*

Готовят для использования в качестве внутреннего стандарта раствор 4-метил-2-пентанол,1 г/л, с добавлением 10% (об./об.) раствора этанола.

Готовят образец раствора для последующего анализа, добавив 5 мл раствора внутреннего стандарта к 50 мл винного дистиллята, полученного методом, описанным в главе *Крепость алкоголя*

Готовят контрольный раствор этилацетата, 50мг/л, в 10% (об./об.) растворе этанола. Добавляют 5 мл раствора внутреннего стандарта к 50 мл данного раствора.

Анализируют 2 мкл образца анализируемого раствора и контрольного раствора, используя метод газовой хроматографии.

Температура печи должна быть 90°C, а расход газа-носителя должен составлять 25 мл в минуту.

2.3 *Расчеты*

S = площадь пика этилацетата в контрольном растворе.

S_x = площадь пика этилацетата в исследуемом растворе.

i = площадь пика внутреннего стандарта в исследуемом растворе.

I = площадь пика внутреннего стандарта в контрольном растворе.

Концентрация этилацетата, выраженная в миллиграммах на литр, определяется выражением:

$$50 \times \frac{I}{i} \times \frac{S_x}{S}$$

Метод OIV-MA-AS315-02B Метод IV типа

Этилацетат

1.Сущность метода

Этилацетат отделяется за счет дистилляции вина, доведенного до pH 6.5. После омыления и соответствующей концентрации в щелочной среде дистиллят подкисляют, а пар конденсируют для отделения уксусной кислоты, высвобождаемой при омылении; кислотную часть титруют щелочным раствором.

2. Методика

2.1 *Реактивы*

2.1.1 Раствор гидроксила натрия, 1 M

2.1.2 pH 6.5 буферный раствор

Дигидрофосфат калия, KH_2PO_4 ..... 5 г

Раствор гидроксида натрия 1 M ..... 50 мл

Вода (до) ..... 1 л

2.1.3 Кристаллическая винная кислота

2.1.4 Раствор гидроксида натрия, 0.02 M

2.1.5 Нейтральный раствор фенолфталеина, 1%, в спирте, 96% (об./об.).

2.2 *Проведение исследования*

В мерную колбу объемом 500 мл добавляют 100 мл негазированного вина, нейтрализованного с *n* мл 1M раствора гидроксида натрия, где *n* является объемом раствора гидроксида натрия, 0.1M, используемого для измерения общей кислотности 10 мл вина. Добавляют 50 мл pH 6.5 буферного раствора и дистиллируют. Дистилляция должна быть проведена с использованием конической трубки и круглодонной колбы объемом 500 мл, содержащей 5 мл раствора гидроксида натрия (1M), на которой сделана отметка, указывающая объем приблизительно 35 мл. Собирают 30 мл дистиллята.

Закрывают колбу пробкой и дают постоять в течение часа. Сгущают содержимое колбы примерно до 10 мл, поместив ее на баню с кипящей водой и продувая быстрым потоком воздуха чашу колбы. Дают остыть. Добавляют 3г винной кислоты (2.1.3). Удаляют углекислый газ путем встряхивания в вакууме. Жидкость из концентрационной колбы переносят в барботажную камеру аппарата для паровой дистилляции и дважды промывают колбу при помощи 5 мл воды. Выпаривают и восстанавливают минимум 250 мл дистиллята.

Титруют с использованием раствора гидроксида натрия (0.02M) в присутствии фенолфталеина.

2.3 *Расчеты*

Пусть n — количество миллилитров используемого раствора гидроксида натрия 0.02 M (2.1.4). 1 мл соответствует 1.76 мг этилацетата. Концентрация этилацетата в миллиграммах на литр определяется по формуле:

$$17.6 \times n$$

БИБЛИОГРАФИЯ

PEYNAUD E., Analyse et contrôle des vins, Librairie Polytechnique Ch.-Béranger, 1958

Метод OIV-MA-AS315-03 Метод IV типа

Дигликозид мальвидина

1. Сущность метода

Дигликозид мальвидина, окисляясь азотной кислотой, превращается в вещество, которое в аммиачной среде излучает яркое зеленое свечение в ультрафиолетовом свете.

Интенсивность флуоресценции образовавшегося соединения измеряют путем сравнения с флуоресценцией раствора, оттитрованного сульфатом хинина, интенсивность свечения которого титруется контрольным образцом дигликозида мальвидина.

Свободный диоксид серы, ослабляющий свечение, необходимо предварительно соединить с избыточным ацетальдегидом.

2. Качественный анализ

2.1 *Используемое оборудование*

2.1.1 Ультрафиолетовая лампа, позволяющая проводить измерения при 365 нм.

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Раствор ацетальдегида

Кристаллизуемый паральдегид.....10 г
Этанол 96% (об./об.) .....100 мл

2.2.2 Соляная кислота, 1.0 М.

2.2.3 Раствор нитрата натрия, 10 г/л.

2.2.4 Этанол, 96% (об./об.), содержащий 5% концентрированный раствор аммиака (ρ_{20} = 0,92 г/мл).

2.2.5 Контрольное вино, содержащее 15 мг дигликозида мальвидина на литр.

2.2.6 Вино, не содержащее дигликозида мальвидина.

2.3 *Проведение исследования*

В пробирку добавляют:

- 10 мл вина
- 1.5 мл раствора ацетальдегида

ждут 20 минут.

В центрифужную пробирку объемом 20 мл помещают:

- 1 мл вина, вступившего в реакцию с ацетальдегидом
- 1 каплю соляной кислоты
- 1 мл раствора нитрата натрия

Размешивают; ждут 2 минуты (максимум 5 минут), добавляют:

- 10 мл аммиачного этанола

Аналогичным образом обрабатывают 10 мл вина, содержащего 15 мг/л диглюкозида мальвидина (контрольный образец вина). Размешивают. Ждут 10 минут и центрифугируют.

Сливают светлые жидкости из верхнего слоя в калиброванные пробирки. Следят за разницей в зеленом свечении между тестовым вином и контрольным вином в ультрафиолетовом свете с длиной волны 365 нм.

Для розовых вин можно повысить чувствительность, используя:

- 5 мл вина, обработанного ацетальдегидом (2.3)
- 0.2 мл соляной кислоты, 1 М (2.2.2)
- 1 мл раствора нитрата натрия, 10 г/л (2.2.3)
- 5.8 мл аммиачного этанола (2.2.4)

Аналогичным образом обрабатывают контрольное вино.

2.4 *Интерпретация результатов*

Вина, которые не излучают свечение, или имеют заметно более низкое свечение, чем контрольный образец, можно считать не содержащими диглюкозид мальвидина. Те вина, у которых свечение немного меньше, такое же или большее, чем у контрольного образца, должны быть подвергнуты количественному анализу.

3. **Количественный анализ**

3.1. *Используемое оборудование*

3.1.1. Оборудование для измерения флуоресценции:

- длина волны возбуждающего света 365 нм;
- длина волны флуоресцентного излучения 490 нм.

3.1.2. Оптическая кварцевая ячейка (длина оптического пути 1 см)

3.2 *Реактивы*

3.2.1. См. раздел качественное исследование

3.2.2. 2 мг/л раствора хинина сульфата

Готовят раствор, содержащий 10 мг очень чистого сульфата хинина в 100 мл 0,1 М серной кислоты. Разбавляют 20 мл этого раствора до 1 л раствором серной кислоты 0,1 М.

3.3 *Проведение исследования*

Обрабатывают вино методом, описанным в разделе *качественный анализ (2),* с учетом того, что аликвота обработанного ацетальдегидом вина в каждом случае (красные и розовые вина) равняется 1мл.

Помещают раствор хинина сульфата с концентрацией 2 мг/л в ячейку, регулируют флуориметр на полный диапазон (пропускание Т, равное 100%), регулируя ширину щели или чувствительность.

Заменяют эту пробирку на ту, что содержит тестовое вино: это будет показатель T_1

Если коэффициент пропускания T_1 больше 35, разбавляют вино вином без мальвидин диглюкозида, показатель флуоресценции которого должен быть менее 6% (это должно быть подтверждено предыдущим тестированием).

Примечание:

1. Салициловая кислота (салицилат натрия), добавленная в вино для стабилизации перед анализом, вызывает ложную флуоресценцию, которую можно устранить путем экстракции эфиром.

2. Ложную флуоресценцию вызывает добавление карамели.

3.4 *Расчеты*

Интенсивность флуоресценции, равная 1, для вина без SO_2 для указанных выше рабочих условий, за исключением обработки ацетальдегидом, соответствует 0,426 мг мальвидин диглюкозида на литр вина.

С другой стороны, красные и розовые вина, не содержащие мальвидин диглюкозид, дают флуоресценцию, соответствующую значению Т порядка 6%.

Таким образом, количество мальвидин диглюкозида в вине в миллиграммах на литр составляет:

$$(T_1 - 6)\ 0{,}426 \times \frac{11{,}5}{10} \quad (T_1 - 6) \times 0{,}49$$

Если вино разбавлено, умножают результат на коэффициент разбавления.

3.5 *Выражение результатов*

Количество мальвидин диглюкозида выражается в миллиграммах на литр вина с округлением до ближайшего целого числа.

БИБЛИОГРАФИЯ

DORIER P., VERELLE L., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1966, **59,** 1. GAROGLIO P.G., *Rivista Vitic. Enol.,* 1968, **21,** 11.
BIEBER H., *Deutsche Lebensm. Rdsch.,* 1967, 44-46.
CLERMONT Mlle S., SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1976 n° 586.

Метод OIV-MA-AS315-04 Метод II типа

Этиловый карбамад

(Резолюция Oeno 8/98)

Анализ этилкарбамата в алкогольных напитках: селективный метод обнаружения с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии

(Применимо для определения концентраций этилкарбамата от 10 до 200 мкг/л).

(Внимание: важно соблюдать меры безопасности при работе с химическими продуктами, этанолом, ацетоном и канцерогенными продуктами: этилкарбаматом и дихлорметаном. Необходимо избавиться от использованных растворителей подходящим способом, совместимым с применимыми экологическими нормами и правилами).

1. Сущность метода

К пробе добавляют пропилкарбамат в качестве внутреннего стандарта, раствор разбавляют водой и помещают в колонку для твердофазной экстракции объемом 50 мл. К пробе добавляют пропилкарбамат в качестве внутреннего стандарта, раствор разбавляют водой и помещают в колонку для твердофазной экстракции объемом 50 мл. Этилкарбамат и пропилкарбамат элюируют дихлорметаном. Элюат концентрируют на роторном испарителе в вакууме. Концентрат анализируют с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии с использованием выбранного режима мониторинга ионов.

2. Используемое оборудование

2.1 Газовый хроматограф/масс-спектрометр (GC/MS). С выбранным мониторингом ионов (SIM) и системой обработки данных. Желательно наличие автоматического пробоотборника.

2.2 Капиллярная колонка из плавленого кварца: 30 м* × 0,25 мм ∅ внутр., 0,25 мкм карбовокса Тип 20М.

2.3 Условия работы: инжектор 180°C, газ-носитель гелий со скоростью 1 мл/мин при 25°C, безраздельный впрыск. Температурная программа: 40°C в течение 0,75 мин, затем программа 10°C/мин до 60°C, затем 3°C**/мин до 150°C, последующий цикл: повышают до 220°C и выдерживают в течение 4.25 мин при 220°C. Время удерживания

этилкарбамата составляет 23–27 мин, у пропилкарбамата 27–31 мин.

Интерфейс GC/MS: линия передачи 220°C. Параметры масс-спектрометра настроены вручную с помощью перфтортрибутиламина и оптимизированы для более низкой чувствительности к массе, режима селективного ионного мониторинга (SIM), задержки растворителя и времени для начала захвата 22 мин., время выдержки/ион 100 мс.

2.4 Ротационный испаритель в вакууме или система концентрирования, аналогичная концентратору Кудерна Даниш. (Примечание: степень извлечения пробы этилкарбамата (3.7) во время процесса должна составлять 90–110 %).

2.5 Колба - грушевидная, 300 мл, одногорлая, со стандартным конусом 24/40.

2.6 Концентраторная пробирка - 4 мл, градуированная, со стандартным конусом 19/22, соединением и пробкой с тефлоновым покрытием.

3. Реактивы

3.1 *Ацетон* - качество HPLC. *Примечание*. Проверяют каждую партию с помощью GC/MS перед использованием на предмет отсутствия отклика на ионы с м/з 62, 74 и 89.

3.2 *Дихлорметан* - *примечание*: анализируют каждую партию перед использованием с помощью GC/MS после 200-кратного концентрирования, чтобы проверить отсутствие отклика на ионы с отношением м/з 62, 74 и 89.

3.3 Этанол - *безводный*

3.4 Стандартные *растворы этилкарбамата (EC)*

- (1) Исходный раствор – 1.00 мг/мл. Взвешивают 100 мг EC (чистота ≥ 99%) в мерной колбе вместимостью 100 мл и разбавляют до верхней отметки ацетоном.
- (2) Стандартный рабочий раствор – 10.0 мкг/мл. Переносят 1 мл маточного раствора EC в мерную колбу вместимостью 100 мл и разбавляют ацетоном до верхней отметки.

---

* Для определенных вин, которые особенно насыщены, желательно использовать капиллярную колонку длиной 50 м.

** Для некоторых вин, которые особенно насыщены, желательно использование температурной программы 2°C в минуту.

3.5 *n-пропилкарбамат (PC), стандартные растворы.*.

- (1) Исходный раствор – 1.,00 мг/мл. Взвешивают 100 мг PC (качество реагента) в мерную колбу на 100 мл и доводят до верхней отметки ацетоном.

- (2) Стандартный рабочий раствор – 10.0 мкг/мл. 1 мл исходного раствора PC переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и разбавляют ацетоном до верхней отметки.

- (3) Раствор внутреннего стандарта PC - 400 нг/мл. Добавляют 4 мл стандартного рабочего раствора PC в мерную колбу вместимостью 100 мл и разбавляют водой до верхней отметки.

3.6 *EC - стандартные калибровочные растворы nPC*- Разбавляют стандартные рабочие растворы EC, 3.4 (2) и PC 3.5 (2) дихлорметаном, чтобы получить:

(1) 100 нг EC и 400 нг *n*PC/мл,

(2) 200 нг EC и 400 нг *n*PC/мл,

(3) 400 нг EC и 400 нг *n*PC/мл,

(4) 800 нг EC и 400 нг *n*PC/мл,

(5) 1600 нг EC и 400 нг *n*PC/мл.

3.7 Тестовый образец - 100 нг EC/мл в 40 % этаноле. 1 мл стандартного рабочего раствора EC, 3.4 (2) добавить в мерную колбу вместимостью 100 мл и разбавить 40 % этанолом до верхней отметки.

3.8 Колонка для твердофазной экстракции. Одноразовый материал, предварительно заполненный диатомовой землей, емкость 50 мл.

(*Примечание*: перед анализом проверяют каждую партию экстракционных колонок на извлечение EC и nPC и отсутствие отклика на ионы с м/з 62, 74 и 89.) Готовят 100 нг EC/мл испытуемого образца 3.7. Анализируют 5.00 мл испытуемого образца, как описано в пунктах 4.1, 4.2, 5 и 6. Получение 90-110 нг EC/мл будет являться удовлетворительным результатом. Адсорбенты с неравномерным диаметром частиц могут приводить к медленной скорости потока, что влияет на извлечение ECи nПК.

Если после нескольких попыток 90-110 % значения тестового образца не было получено, заменяют колонку или используют скорректированную калибровочную кривую восстановления для количественного определения EC.

Чтобы получить скорректированную калибровочную кривую, готовят стандартные растворы, как описано в пункте 3.6, используя 40 % этанол вместо дихлорметана.

Анализируют 1 мл стандартного калибровочного раствора, как описано в пунктах 4, 5 и 6. Строят новую кривую стандартизации, используя соотношение EC/nPC в экстрагированных стандартах.

4. Подготовка тестового образца

Помещают исследуемый материал в 2 отдельных химических стакана по 100 мл, используя следующие пропорции:

4.1 Вина, содержащие более 14 % об. спирт: 5.00 мл ± 0.01 мл.

4.2 Вина, содержащие не более 14% об. спирта: 20,00 мл ± 0,01 мл.

В каждый химический стакан добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта PC, 3.5 (3) и воду, чтобы получить общий объем 40 мл (или 40 г).

5. Экстракция

(*Примечание*: Экстракцию проводить под вытяжным шкафом с достаточной вентиляцией.) Помещают разбавленную тестовую пробу из пункта **4** в экстракционную колонку.

Промывают стакан 10 мл воды и переносят промывочную воду в колонку. Дают жидкости впитаться в колонку в течение 4 минут. Элюируют с использованием 2*80 мл дихлорметана.

Собирают элюат в грушевидной колбе объемом 300 мл.

Выпаривают элюат до 2–3 мл на роторном испарителе на водяной бане при 30°C (*примечание*: не позволяют экстракту испаряться досуха).

Помещают концентрированный остаток в градуированный концентратор объемом 4 мл с помощью 9-дюймовой пипетки Пастера.

Промывают колбу 1 мл дихлорметана и помещают промывочную жидкость в пробирку.

Сконцентрируют образец до объема 1 мл в слабом потоке азота.

Если используется автоматический пробоотборник, помещают концентрат в виалу для анализа GC/MS.

6. Анализ GC/MS

6.1 *Калибровочная кривая* - вводят по 1 мкл каждого калибровочного стандартного раствора 3.6 в GC/MS. Строят график отношения площадей EC-nPC для отклика на ион м/з 62 по оси y и количества EK в нг/мл по оси x (т. е. 100, 200, 400, 800, 1600). нг/мл).

6.2 *Определение количества EC*- Вводят 1 мкл концентрированного экстракта из пункта 5 в систему GC/MS и рассчитывают

соотношение площадей EC-nPC для иона м/з 62. Определяют концентрацию EC (нг/мл) в экстракте, используя кривую стандартизации внутреннего стандарта. Рассчитывают концентрацию EC в испытуемом образце (нг/мл), разделив количество EC (нг/мл) в экстракте на объем EC в испытуемом образце 3.7.

6.3 *Подтверждение наличия EC.*

Определят, появляется ли реакция на ионы с м/з 62, 74 и 89 во время удерживания EC. Эти отклики характерны соответственно для основных фрагментов $(M - C_2H_3)^+$ и $(M - CH_3)^+$ и для молекулярного иона (M). Наличие EC подтверждается, если соотношение этих ионов не превышает 20 % от соотношения стандарта EC. Экстракт может нуждаться в дальнейшем концентрировании, чтобы получить достаточную реакцию на ион с м/з 89.

7. Производительность метода

Образец		Среднее значение обнаруженного EC, нг/г,	Восстановление добавленного EC, %	s_r	S_R	RSD_r %	RSD_R%
Вино крепостью более 14%		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
Вино крепостью менее 14%		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

Метод OIV-MA-AS315-05A Метод IV типа

Гидроксиметилфурфурол (HMF)

1. Сущность метода

Альдегиды, полученные из фурана, главным из которых является гидроксиметилфурфурол, реагируют с барбитуровой кислотой и пара-толуидином с образованием соединения красного цвета, длина волны которого определяется колориметрически в 550 нм.

Свободная сернистая кислота мешает определению. Когда ее количество превышает 10 мг/л, ее необходимо предварительно устранить, соединив с ацетальдегидом, избыток которого не мешает определению.

2. Колориметрический метод

2.1 *Используемое оборудование*

2.1.1 Спектрофотометр для измерений в диапазоне длин волн от 300 до 700 нм.

2.1.2 Стеклянные кюветы с оптическим путем 1 см.

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Раствор барбитуровой кислоты, 0,5% (масс./об.)

Растворяют 500 мг барбитуровой кислоты в дистиллированной воде, слегка нагревая на водяной бане при 100°C. Доводят до 100 мл дистиллированной водой. Этот раствор хранится около недели.

2.2.2 Раствор пара-толуидина, 10% (масс./об.)

Помещают 10 г пара-толуидина в мерную колбу объемом 100 мл; добавляют 50 мл изопропанола, $CH_3CH(OH)CH_3$ и 10 мл ледяной уксусной кислоты CH_3COOH (ρ_{20} = 1.05 г/мл). Доводят до 100 мл, добавив изопропанол. Этот раствор следует обновлять ежедневно.

2.2.3 Раствор ацетальдегида (этаналя), 1% (масс./об.). Готовят непосредственно перед использованием.

2.2.4 Раствор гидроксиметилфурфурола, 1 г/л.

Готовят несколько вариантов вышеуказанного раствора, содержащие 5, 10, 20, 30 и 40 мг гидроксиметилфурфурола/л соответственно. Раствор 1 г/л и его разведенные варианты должны быть свежеприготовленными.

2.3 *Проведение исследования*

2.3.1 Приготовление образца

- Свободный диоксид серы менее 10 мг/л:

  Проводят анализ 2 мл вина или сусла. При необходимости фильтруют вино или сусло перед анализом.

- Свободный диоксид серы более 10 мг/л:

  15 мл испытуемых образцов необходимо поместить в сферическую колбу вместимостью 25 мл с 2 мл раствора ацетальдегида (2.2.3). Размешивают. Ждут 15 минут. Доводят до необходимого объема, добавив дистиллированную воду. При необходимости фильтруют. Выполняют анализ 2 мл этого раствора.

2.3.2 Колориметрическое определение

В каждую из двух колб емкостью 25 мл, а и б, снабженных притертыми стеклянными пробками, помещают по 2 мл образца, приготовленного в соответствии с пунктом 2.3.1. Добавляют в каждую колбу по 5 мл раствора пара-толуидина (2.2.2); Перемешивают. Добавляют 1 мл дистиллированной воды в колбу б (контрольную) и 1 мл раствора барбитуровой кислоты (2.2.1) в колбу а, встряхните, чтобы перемешать. Помещают содержимое колб в кюветы спектрофотометра с оптическим путем 1 см. Обнуляют шкалу поглощения при длине волны 550 нм, используя содержимое колбы b.

Следят за изменением оптической плотности содержимого колбы а; записывают максимальное значение А, которое достигается через 2-5 минут.

Образцы с концентрацией гидроксиметилфурфурола выше 30 мг/л должны быть разбавлены перед анализом.

2.3.3 Подготовка калибровочной кривой

Помещают по 2 мл каждого из растворов гидроксиметилфурфурола с концентрацией 5, 10, 20, 30 и 40 мг/л в два набора колб по 25 мл, а и б, и обрабатывают их, как описано в пункте 2.3.2.

График, представляющий изменение абсорбции в зависимости от концентрации гидроксиметилфурфурола в мг/л, должен

представлять собой прямую линию, проходящую через начало координат.

2.4 *Выражение результатов*

Концентрацию гидроксиметилфурфурола устанавливают, нанося на калибровочную кривую показатель оптической плотности, определенный для анализируемого образца с учетом любого проведенного разбавления.

Результат выражается в миллиграммах на литр (мг/л) с точностью до одной десятой.

Метод OIV-MA-AS315-05B Метод IV типа

Гидроксиметилфурфурол (HMF)

1. Сущность метода

Разделение через колонку методом обращённо-фазовой хроматографии и определение при 280 нм.

Процедуры, описанные ниже, приведены в качестве примеров.

2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

2.1 *Используемое оборудование*

2.1.1 Высокоэффективный жидкостный хроматограф со следующим оборудованием:

- петлевой инжектор, 5 или 10 мкл
- спектрофотометрический детектор, позволяющий проводить измерения при 280 нм
- колонка с кремнеземом, связанным с октадецилом (например, Bondapak C_{18}-Corasil, Waters Ass)
- записывающее устройство, желательно интегратор
- Скорость потока подвижной фазы: 1.5 мл/мин.

2.1.2 Мембранная система фильтрации с диаметром пор 0.45 мкм.

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Дистиллированная вода двойной очистки

2.2.2 Метанол дистиллированный или качества HPLC

2.2.3 Уксусная кислота (ρ_{20} = 1,05 г/мл)

2.2.4 Подвижная фаза: вода + метанол + уксусная кислота, предварительно профильтрованная через мембранный фильтр 0.45 мкм, (40 мл + 9 мл + 1 мл)

Подвижную фазу необходимо готовить ежедневно и дегазировать перед использованием.

2.2.5 Эталонный раствор гидроксиметилфурфурола, 25 мг/л (масс./об.)

В мерную колбу объемом 100 мл помещают 25 мг гидроксиметилфурфурола (взвешивают с особой точностью) и доводят до нужного объема метанолом. Разбавляют этот раствор метанолом 1/10 и фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Если раствор хранить в холодильнике в герметично закрытой бутыли из коричневого стекла, срок его хранения составит 2-3 месяца.

2.3 *Проведение исследования*

Вводят 5 (или 10) мкл образца, приготовленного, как описано выше, и 5 (или 10) мкл контрольного раствора гидроксиметилфурфурола в хроматограф. Записывают хроматограмму.

Время удерживания гидроксиметилфурфурола составляет от шести до семи минут.

2.4 *Выражение результатов*

Концентрация гидроксиметилфурфурола выражается в миллиграммах на литр (мг/л) с точностью до одной десятой.

Метод OIV-MA-AS315-06 Метод IV типа

Производные цианида

(Резолюция Oeno 4/94)

1. Сущность метода

Свободная и общая синильная кислота высвобождается кислотным гидролизом и отделяется перегонкой. Образовавшийся глутаконовый диальдегид после реакции с хлорамином Т и пиридином определяют колориметрически, благодаря синей окраске, которая появляется из-за взаимодействия с 1,3-диметилбарбитуровой кислотой.

2. Используемое оборудование

2.1. Аппарат для дистилляции: Используют аппарат для дистилляции, предназначенный для определения спирта в вине.

2.2. Круглодонная колба на 500 мл со стандартным коническим соединением.

2.3. Водяная баня, термостатированная при 20°C.

2.4. Спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность при длине волны 590 нм.

2.5. Стеклянная кювета или одноразовые кюветы для одноразового использования с оптическим путем 20 мм.

3. Реактивы

3.1. Фосфорная кислота (H_3PO_4) на 25 р. 100 (масса/объем)

3.2. Раствор хлорамина Т ($C_7H_7\ ClNNaO_2S.3H_2O$) 3% (масса/объем)

3.3. Раствор 1,3-диметилбарбитуровой кислоты: растворяют3,658 г 1,3-диметилбарбитуровой кислоты ($C_6H_8N_2O_3$) растворяют в 15 мл пиридина и 3 мл соляной кислоты (ρ_{20} = 1.19 г/мл) и доводят дистиллированной водой до объема 50 мл.

3.4. Цианид калия (KCN)

3.5. Раствор йодида калия (KI) 10% (масса/объем)

3.6. Раствор нитрата серебра ($AgNO_3$), 0,1 M

4. Проведение исследования

4.1 Дистилляция:

В круглодонную колбу вместимостью 500 мл (2.2) помещают 25 мл вина, 50 мл дистиллированной воды, 1 мл фосфорной кислоты (3.1) и несколько стеклянных шариков. После этого немедленно ставят круглодонную колбу на перегонный аппарат. Собирают дистиллят через нагнетательную трубку, соединенную с мерной колбой на 50 мл, содержащей 10 мл воды. Мерную колбу погружают в баню с ледяной водой. Собирают дистиллят через нагнетательную трубку, соединенную с мерной колбой на 50 мл, содержащей 10 мл воды. Мерную колбу погружают в баню с ледяной водой. Собирают 30-35 мл дистиллята (всего около 45 мл жидкости в мерной колбе). Промывают нагнетательную трубку несколькими миллилитрами дистиллированной воды, доводят дистиллят до 20°C и разбавляют дистиллированной водой до верхней отметки.

4.2 Измерение:

Помещают 25 мл дистиллята в колбу Эрленмейера вместимостью 50 мл, закрытую стеклянной пробкой, добавляют 1 мл раствора хлорамина Т (3.2) и плотно закрывают пробкой. Ровно через 60 секунд добавляют 3 мл раствора 1,3-диметилбарбитуровой кислоты (3.3), плотно закрывают пробкой и оставляют на 10 минут.

Затем измеряют оптическую плотность относительно контрольного бланка (25 мл дистиллированной воды вместо 25 мл дистиллята) при длине волны 590 нм в кюветах с оптическим путем 20 мм.

5. Установление стандартной кривой

5.1 *Аргентометрическое титрование цианида калия*

В мерной колбе вместимостью 300 мл растворяют примерно 0.2 г KCN (3.4) в 100 мл дистиллированной воды. Добавляют 0.2 мл раствора йодида калия (3.5) и титруют 0.1 M раствором нитрата серебра (3.6) до получения стабильной желтоватой окраски.

При расчете концентрации KCN в образце, 1 мл 0.1 M раствора нитрата серебра соответствует 13.2 мг KCN.

5.2 *Стандартная кривая*.

5.2.1. Приготовление стандартных растворов:

Зная концентрацию KCN, определенную в соответствии с пунктом 5.1, готовят стандартный раствор, содержащий 30 мг/л синильной кислоты (30 мг HCN = 72,3 мг KCN). Разбавляют этот раствор до 1/10.

В мерные колбы вместимостью 100 мл добавляют 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 и 5.0 мл разбавленного стандартного раствора и добавляют дистиллированной воды до нужного объема. Приготовленные стандартные растворы соответствуют 30, 60, 90 и 150 мкг/л синильной кислоты соответственно.

5.2.2. Определение:

Используя 25 мл растворов, продолжают процесс, как описано в пунктах 4.1 и 4.2. Значения оптической плотности, полученные при анализе этих стандартных растворов, выраженные в зависимости от уровня содержания синильной кислоты, образуют линию, проходящую через начало координат.

6. Выражение результатов

Синильная кислота выражается в микрограммах на литр (мкг/л) без десятичной точки.

6.1. Расчеты:

Определяют концентрацию синильной кислоты, используя стандартную кривую. Если исследуемый образец был разбавлен, умножают полученный результат на коэффициент разбавления.

Повторяемость (r) и воспроизводимость (R)

Белое вино: r =3.1 мкг/л приблизительно 6% . X_i

R = 12 мкг/л приблизительно 25% . X_i

Красное вино: r =6.4 мкг/л приблизительно 8% . X_i

R = 23 мкг/л приблизительно 29% . X_i

X_i = средняя концентрация HCN в вине.

БИБЛИОГРАФИЯ

1) JUNGE C., Feuillet vert N° 877 (1990)
2) ASMUS E. GARSCHLAGEN H., Z Anal. Chem. 138, 413-422 (1953)
3) WÜRDIG G., MÜLLER TH., Die Weinwissenschaft 43, 29-37 (1988)

Метод OIV-MA-AS315-07A Метод IV типа

Исследование искусственных подсластителей

1. Сущность метода

Исследование сахарина (бензойный сульфимид), дульцина (п-этоксифенилмочевины), цикламата (циклогексилсульфамат) и P-4000 (5-нитро-2-пропоксианилин или 1-пропокси-2-амино-4-нитробензол).

После концентрирования вина сахарин, дульцин и P-4000 экстрагируют в кислой среде бензолом; цикламат извлекается из вина после экстракции бензола этилацетатом (порядок экстракции важен). Остатки после выпаривания растворителя подвергают тонкослойной хроматографии.

Сахарин и цикламат идентифицируют хроматографией на целлюлозных пластинах (растворитель: ацетон-этилацетат-гидроксид аммония), сначала в бензольном экстракте, а затем в экстракте этилацетатом после очистки с помощью эфира.

Эти подсластители проявляют опрыскиванием раствором бензидина; анилина; ацетата меди и имеют следующий фактор удерживания (Rf): цикламат - 0,29, сахарин - 0,46.

P-4000 и дульцин из бензольного экстракта разделяют хроматографией на полиамидных пластинах (растворитель: толуол, метанол, ледяная уксусная кислота). Эти подсластители проявляют распылением раствора п-диметиламинобензальдегида и имеют следующие следующий фактор удерживания (Rf): 0.60 для Дульцина, 0,80 для P-4000.

2. Методика

Исследование сахарина, цикламата, дульцина и P-4000.

2.1 *Используемое оборудование*

2.1.1 Хроматографический резервуар

2.1.2 Микрометрические шприцы или микропипетки

2.1.3 Сепараторная трубка с запорным краном диаметром 15 мм и длиной 180 мм

2.1.4 Водяная баня при 100°C

2.1.5 Регулируемая духовка, способная разогреваться до 125°C

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Экстракционный растворитель:

- Бензол
- Этилацетат

2.2.2 Растворители для хроматографии:

Смесь №1:

Ацетон	60 частей
Этилацетат	30 частей
Гидроксид аммония (ρ_{20} = 0.92 г/мл)	10 частей

Смесь №2:

Толуол	90 частей
Метанол	10 частей
Ледяная уксусная кислота (ρ_{20} = 1.05 г/мл)	10 частей

2.2.3. Хроматографические пластины (20 x 20 см):

- со слоем целлюлозного порошка (например, Whatman CC 41 или Macherey-Nagel MN300)
- со слоем полиамидного порошка (например, Merck)

2.2.4 Индикаторный реагент для сахарина и цикламата

Готовят:

- спиртовой раствор бензидина 250 мг в 100 мл этанола
- насыщенный раствор ацетата меди $Cu(C_2H_3O_2)_2.H_2O$
- свежеперегнанный анилин

Смешивают: 15 мл раствора бензидина, 1 мл анилина и 0,75 мл насыщенного раствора уксуснокислой меди.

Этот раствор должен быть свежеприготовленным. Он соответствует объему, необходимому для проявления пластины размером 20 x 20 см.

2.2.5 Соляная кислота 50% (об./об.),

2.2.6 Раствор азотной кислоты, 25% (об./об.),

2.2.7 Индикаторный реагент для P-4000 и Дульцина: растворяют 1 г 1,4-парадиметиламинобензальдегида в 50 мл метанола; добавляют 10 мл 25% азотной кислоты; доводят объем до 100 мл метанолом.

Используют 15 мл этого реагента для проявления пластины 20 x 20 см.

2.2.8 Циклогексилсульфаминовая кислота в водно-этанольном растворе 0,10 г/100 мл

Растворяют 100 мг натриевой или кальциевой соли циклогексилсульфаминовой кислоты в 100 мл смеси воды и этанола в равных долях.

2.2.9 Водный раствор сахарина, 0.05 г/100 мл

2.2.10 Дульцин, 0.05 г/100 мл
метанола.

2.2.11 P-4000, 0,05 г/100 мл метанола.

2.3 *Проведение исследования*

2.3.1 Экстракция

100 мл вина, помещенного в стакан, необходимо быстро выпарить кипячением до уменьшения объема до 30 мл, направляя при этом на поверхность колбы струю холодного воздуха. Дают остыть. Окисляют с помощью 3 мл 50% соляной кислоты (об./об.). Переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл с притертой пробкой, добавляют 40 мл бензола и перемешивают механической мешалкой в течение 30 мин. Переносят в делительную воронку для отделения органической фазы.

Если образовалась эмульсия, ее необходимо отделить центрифугированием. Помещают органическую фазу в коническую колбу с притертой пробкой.

Декантируют предварительно экстрагированное бензолом вино, соответствующее нижнему слою делительной воронки, в коническую колбу с притертой пробкой объемом 500 мл, содержащую 40 мл этилацетата. Перемешивают в течение 30 минут и отделяют органическую фазу, как и прежде, стараясь восстановить только органическую фракцию, а не вино.

На водяной бане при 100°C выпаривают каждый экстракционный растворитель в чашках для выпаривания диаметром 50-60 мм, небольшими порциями, направляя струю холодного воздуха на поверхность чашек. Продолжают выпаривание до тех пор, пока

остаток не приобретет сиропообразную консистенцию, остановившись до завершения выпаривания.

Остаток бензольного экстракта повторно растворить в чашке для выпаривания, используя 0.5 мл водно-этанольного раствора (1:1), (рекомендуется однократно растворить остаток в 0.25 мл водно-этанольного раствора, а затем промыть чашку другой порцией, используя 0.25 мл того же раствора). Помещают водно-этанольный экстракт в маленькую пробирку с притертой пробкой (экстракт В).

Остаток из чашки, в которой был выпарен этилацетат (содержащий цикламат), растворяют в 0.5 мл воды и выливают в небольшую сепараторную трубку. Промывают чашку 10 мл эфира и добавляют эфир к содержимому сепараторной трубки. Энергично перемешивают в течение 2 минут и отделяют нижний слой в небольшую тестовую пробирку, содержащую 0.5 мл этанола. Он включает в общей сложности 1 мл водно-этанольного раствора, который содержит возможный цикламат (экстракт А).

2.3.2 Хроматография

2.3.2.1 Сахарин и цикламат

Для исследования сахарина и цикламата используют целлюлозную пластину, при этом половина пластины предназначена для идентификации цикламата, а другая половина – для сахарина.

Для этого наносят от 5 до 10 мкл экстракта А и 5 мкл стандартного раствора цикламата на одну часть пластины. На вторую часть наносят 5 до 10 мкл экстракта Б и 5 мкл стандартного раствора сахарина. Помещают подготовленную пластину в хроматографическую баню, содержащую растворитель №1 (ацетон; этилацетат; гидроксид аммония);

дожидаются, пока площадь растворителя не достигнет 10-12 см. Достают пластину из ванны и высушивают теплым воздухом. Равномерно и осторожно опрыскивают пластину бензидиновым реагентом (17–18 мл на каждую пластину). Высушивают пластину холодным воздухом. Помещают пластину в печь, поддерживаемую при температуре 120-125°C, на 3 минуты. Пятна станут темно-серыми на светло-каштановом фоне; со временем они примут коричневатую окраску.

2.3.2.2 *Р-4000 и дульцин*

Помещают 5 мкл экстракта В и 5 мкл стандартных растворов Дульцина и Р-4000 на полиамидной пластине. Помещают подготовленную пластину в хроматографическую емкость с

растворителем № 2 (толуол, метанол, уксусная кислота). Дожидаются, пока площадь растворителя не достигнет размеров 10-12 см.

Вынимают пластину из емкости; высушивают под потоком холодного воздуха. Распыляют на нее 15 мл реагента п-диметиламинобензальдегида, затем высушивают холодным воздухом до появления оранжево-желтых пятен, соответствующих дульцину и Р-4000.

2.3.2.3 *Чувствительность*

Бензидиновый реагент позволяет обнаруживать пятна, соответствующие 2 мкг сахарина и 5 мкг цикламата. Реагент п-диметиламинобензальдегида выявляет 0.3 мкг дульцина и 0.5 мкг Р-4000. Этот метод позволяет определить (в зависимости от эффективности экстракции):

Сахарин	2-3 мг/л
Цикламат	40-50 мг/л
Дульцин	1 мг/л
Р-4000	1-1.5 мг/л

БИБЛИОГРАФИЯ

– TERCERO C., *F.V., O.I.V.,* 1968, n° 277 and *F.V., O.I.V.,* 1970, n° 352.

– Wine Analysis Commission of the Federal Health Department of Germany,1969, *F.V., O.I.V.,* n° 316.

– International Federation of Fruit Juice Manufacturers, 1972, *F.V., O.I.V.,* n°40.

– SALO T., ALRO E. and SALMINEN K., *Z. Lebensmittel Unters. u.Forschung,* 1964, **125,** 20.

Метод OIV-MA-AS315-07B Метод IV типа

Исследование искусственных подсластителей

1. Сущность метода

Исследование сахарина, дульцина и цикламата.

Эти подсластители извлекаются из вина с помощью жидкого ионообменника, затем повторно экстрагируются разбавленным гидроксидом аммония и разделяются с помощью тонкослойной хроматографии с использованием смеси порошка целлюлозы и порошка полиамида (растворитель: ксилол, н-пропанол, ледяная уксусная кислота; муравьиная кислота). Эти подсластители имеют синюю флуоресценцию на желтом фоне в ультрафиолетовом свете после опрыскивания раствором 2.7-дихлорфлуоресцеина.

Последующее опрыскивание раствором 1,4-диметиламинобензальдегида позволяет отличить дульцин, дающий только одно оранжевое пятно, от ванилина и эфиров п-гидроксибензойной кислоты, которые движутся с тем же показателем фактора удерживания.

2. Метод

Исследование сахарина, дульцина и цикламата.

2.1 *Используемое оборудование*

2.1.1 Прибор для тонкослойной хроматографиии

2.1.2 Стеклянная пластина 20 x 20 см.

Приготовление пластин: тщательно перемешивают 9 г сухого порошка целлюлозы и 6 г порошка полиамида. Добавляют при перемешивании 60 мл метанола. Распределяют по пластинам толщиной 0,25 мм. Сушат в течение 10 минут при 70°C. Данного количества достаточно для подготовки 5 пластин.

2.1.3 Водяная баня с регулятором температуры или роторным испарителем

2.1.4 УФ-лампа для исследования хроматографических пластин.

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Петролейный эфир (40-60°)

2.2.2 Ионообменная смола, например: Amberlite LA-2

2.2.3 Уксусная кислота, разбавленная до 20% (об./об.)

2.2.4 Ионообменный раствор: 5 мл ионита энергично перемешивают с 95 мл петролейного эфира и 20 мл 20% уксусной кислоты. Используют верхнюю фазу.

2.2.5 Азотная кислота в растворе, 1 М

2.2.6 Серная кислота, 10 % (об./об.)

2.2.7 Гидроксид аммония, разбавленный до 25% (об./об.)

2.2.8 Полиамидный порошок, например, от производителей Macherey-Nagel или Merck

2.2.9 Порошок целлюлозы, например: Macherey-Nagel MN 300 AC

2.2.10 Растворитель для хроматографии:

Ксилол	45 частей
н-Пропанол.....	6 частей
Ледяная уксусная кислота (ρ_{20} = 1,05 г/мл).....	7 частей
Муравьиная кислота 98-100%	2 части

2.2.11 Проявители:

- раствор 2,7-дихлорфлуоресцеина, 0.2 % (масс./об.) в этаноле,
- раствор 1,4-диметиламинобензальдегида: растворяют 1 г диметиламинобензальдегида, помещенного в мерную колбу объемом 100 мл, примерно в 50 мл этанола. Добавляют 10 мл азотной кислоты, 25% (об./об.), и доводят до нужного объема этанолом.

2.2.12 Стандартный раствор:

- раствор Дульцина, 0,1 % (масс./об.) в метаноле,
- раствор цикламата: раствор, содержащий 1 г натриевой или кальциевой соли циклогексилсульфаминовой кислоты в 100 мл смеси метанола и воды в равных частях,
- раствор ванилина из расчета 1 г/100 мл в смеси метанола и воды в равных частях,
- раствор эфира п-гидроксибензойной кислоты из расчета 1 г/100 мл в метаноле.

2.3 *Проведение исследования:*

50 мл вина помещают в делительную воронку, подкисляют 10 мл разбавленной серной кислоты (2.2.6) и экстрагируют двумя аликвотами ионообменного раствора по 25 мл. 50 мл ионообменного раствора промывают три раза с использованием 50 мл дистиллированной воды, которую затем сливают, после чего промывают три раза с использованием 15 мл разбавленного гидроксида аммония (2.2.7). Полученные растворы аммиака затем осторожно выпаривают при 50°C до полного высыхания на водяной бане или в роторном испарителе. Остаток восстанавливают 5 мл ацетона и 2 каплями 1 M раствора азотной кислоты, фильтруют и снова выпаривают досуха при 70°C на водяной бане. Необходимо избегать слишком долгого нагревания и роста температуры выше 70°C. Остаток восстанавливается с помощью 1 мл метанола. На пластину наносят от 5 до 10 мкл этого раствора и 2 мкл стандартных растворов. Дождитесь, пока растворитель (ксилол: н-пропанол: уксусная кислота: муравьиная кислота) (2.2.10) займет площадь примерно в 15 см, на что уйдет около 1 часа.

После сушки с помощью воздуха раствор дихлорфлуоресцеина тщательно распыляют на пластину. Сахарин и цикламат сразу проявляются в виде светлых пятен на лососевом фоне. При исследовании в ультрафиолетовом свете (254 или 360 нм) три подсластителя проявляются флуоресцентным синим цветом на желтом фоне. Подсластители отделяются на пластине снизу вверх в следующем порядке: цикламат, сахарин, дульцин.

Ванилин и эфиры п-гидроксибензойной кислоты движутся с тем же фактором удержания, что и дульцин. Для выявления дульцина в присутствии этих веществ пластинку затем необходимо опрыскать раствором диметиламинобензальдегида. Дульцин приобретает вид оранжевого пятна, в то время как другие вещества никак не реагируют.

Чувствительность – Количественное ограничение для хроматографической пластины составляет 5 мкг для трех веществ. Этот метод позволяет обнаружить:

Сахарин	10 мг/л
Цикламат	50 мг/л
Дульцин	10 мг/л

БИБЛИОГРАФИЯ

– TERCERO C., *F.V., O.I.V.,* 1968, n° 277 and *F.V., O.I.V.,* 1970, n° 352.

– Wine Analysis Commission of the Federal Health Department of Germany,1969, *F.V., O.I.V.,* n° 316.

– International Federation of Fruit Juice Manufacturers, 1972, *F.V., O.I.V.,* n° 40.

– SALO T., ALRO E. and SALMINEN K., *Z. Lebensmittel Unters. u. Forschung,* 1964, **125,** 20.

Метод OIV-MA-AS315-08 Метод IV типа

Исследование искусственных красителей

1. Сущность метода

Вино концентрируют до 1/3 первоначального объема, подщелачивают раствором разбавленного гидроксида натрия и экстрагируют эфиром. Эфирную фазу после промывки водой экстрагируют разбавленным раствором уксусной кислоты; этот уксуснокислый раствор, подщелочённый аммиаком, доводят до кипения в присутствии куска шерстяной нити, обработанной сернокислым алюминием и виннокислым калием. Краситель, если он есть, фиксируется на шерсти. Шерсть, на которой краситель был зафиксирован, затем помещают в разбавленный раствор уксусной кислоты. После выпаривания уксусного раствора остаток восстанавливают водно-спиртовым раствором и анализируют с помощью тонкослойной хроматографии для определения характеристик красителя.

Водная фаза, остающаяся после экстракции эфиром, может содержать кислые красители. Их извлекают, используя их афинность к волокнам животного происхождения, которые заметно впитывают краску: их фиксируют на шерстяной пробке в минерально-кислотной среде.

Чтобы сконцентрировать красящее вещество, выполняют двойную фиксацию и/или несколько последовательных фиксаций на все более мелких шерстяных пробках.

Окраска пробки указывает на то, что в вино был добавлен искусственный краситель; затем краситель идентифицируют с помощью тонкослойной хроматографии.

2. *Используемое оборудование*

2.1 Стеклянные пластины 20 x 20, покрытые порошком целлюлозы,

2.2 Хроматографический резервуар

3. Реактивы

3.1 Этиловый эфир

3.2 Раствор гидроксида натрия, 5% (масс./об.)

3.3 Ледяная уксусная кислота (ρ_{20} = 1,05 г/мл)

3.4 Разбавленная уксусная кислота, содержащую одну часть ледяной уксусной кислоты на 18 частей воды.

3.5 Разбавленная соляная кислота: к одной части соляной кислоты (ρ_{20} = 1,19 г/мл) добавляют 10 частей дистиллированной воды.

3.6 Гидроксид аммония (ρ_{20} = 0,92 г/мл)

3.7 Белые шерстяные нити, предварительно промытые, обезжиренные эфиром и высушенные.

3.8 Белые шерстяные нити, предварительно промытые, обезжиренные эфиром, высушенные и подкисленные.

Подкислитель: Растворяют 1 г кристаллизованного сульфата алюминия Al2(SO4)18H2O и 1,2 г кислого тартрата калия в 500 мл воды. В раствор помещают 10 г белых шерстяных нитей, предварительно промытых, обезжиренных эфиром и высушенных, и перемешивают около часа. Дают постоять от 2 до 3 часов; сливают, дают высохнуть при комнатной температуре.

3.9 Растворитель №1 для хроматографии красителей с базовыми характеристиками:

н-бутанол	50мл
Этиловый спирт	25 мл
Уксусная кислота (ρ_{20} = 1,05 г/мл)	10 мл
Дистиллированная вода	25 мл

3.10 Растворитель №2 для хроматографии красителей с кислотными характеристиками:

н-бутанол	50 мл
Этиловый спирт	25 мл
Гидроксид аммония (ρ_{20} = 1,05 г/мл)	10 мл
Дистиллированная вода	25 мл

4. Проведение исследования

4.1 *Исследование красителей с базовыми характеристиками.*

4.1.1 Извлечение красящих веществ.

Помещают 200 мл вина в стеклянную коническую колбу объемом 500 мл и кипятят до уменьшения объема до 1/3.

После охлаждения нейтрализуют 5% раствором гидроксида натрия до тех пор, пока естественный цвет вина заметно не изменится.

Совершают экстракцию дважды при помощи 30 мл эфира. Эфирные фазы, содержащие основные красители, подлежащие определению, восстанавливают. Остаток после экстракции необходимо сохранить для анализа кислых красителей.

Дважды промывают экстрагированный эфир 5 мл воды для удаления гидроксида натрия; смешивают с 5 мл разбавленной уксусной кислоты. Полученная кислая водная фаза окрашивается в присутствии основного красителя.

Наличие красителя может быть подтверждено фиксацией на подкисленной шерсти. Сделать полученную кислую водную фазу щелочной с помощью 5% аммиака. Добавить 0.5 г подкисленной шерсти и кипятить около 1 минуты. Промывают шерсть под проточной водой. Если шерсть окрашена, вино содержит один из базовых красителей.

4.1.2 Определение характеристик методом тонкослойной хроматографии.

Водно-уксусную фазу, содержащую основной краситель, концентрируют до 0.5 мл. Если краситель закрепился на кислой шерсти, шерстяную пробку обрабатывают кипячением с 10 мл дистиллированной воды и несколькими каплями уксусной кислоты (ρ_{20} = 1,05г/мл). Удаляют фрагмент шерсти после отжима жидкости. Концентрируют раствор до 0,5 мл.

Помещают 20 мкл этого концентрированного раствора на целлюлозной пластине в 3 см от бокового края и в 2 см от нижнего края пластины.

Помещают пластину в емкость с растворителем №1 так, чтобы нижний край был погружен в растворитель на глубину 1 см.

Когда площадь растворителя на поверхности пластины составит от 15 до 20 см, снимают пластину с резервуара. Дают высохнуть на воздухе.

Идентифицируют краситель с помощью раствора известных искусственных красителей с базовыми характеристиками, нанесенных одновременно на хроматограмму.

4.2 *Исследование красителей с кислотными характеристиками*

4.2.1 Извлечение красящего вещества.

Используют остаток от вина, использовавшегося для исследования красителей с основными характеристиками, концентрированный до 1/3 и нейтрализованный после экстракции эфиром.

Если первая часть процедуры не проводилась, начинают с 200 мл вина, помещают его в коническую колбу и кипятят, пока объем не уменьшится до 1/3.

В обоих случаях затем добавляют 3 мл разведенной соляной кислоты и 0,5 г белой шерсти: кипятят 5 мин, сливают жидкость и промывают шерсть под проточной водой.

В коническую колбу, содержащую шерсть, добавляют 100 мл воды и 2 мл разбавленной соляной кислоты; кипятят 5 минут, отделяют кислую жидкость и повторяют эту процедуру до тех пор, пока жидкость, используемая для промывания, не станет бесцветной.

После того, как шерсть тщательно промыли до полного удаления кислоты, восстанавливают раствор в конической колбе, добавив 50 мл дистиллированной воды и несколько капель гидроксида аммония (ρ_{20}= 0.92 г/мл): доводят до слабого кипения в течение 10 минут, чтобы растворить любой искусственный краситель, оставшийся на шерсти.

Вынимают вату из колбы, доводят объем жидкости до 100 мл и кипятят до полного испарения аммиака. Подкисляют 2 мл разбавленной соляной кислоты (убедитесь, что реакция жидкости определенно кислая, нанеся 1 каплю этой жидкости на индикаторную бумагу).

Добавляют в колбу 60 мг (около 20 см стандартной нити) белой шерсти и кипятят 5 минут; снимают шерсть и промывают ее под проточной водой.

Если после этой процедуры шерсть окрашивается в красный цвет, если речь идет о красном вине, или в желтый цвет, если речь идет о белом вине, то доказано наличие искусственных органических красящих веществ кислой природы.

Если цвет слабый или неопределенный, повторяют обработку аммиаком и делают вторую фиксацию с помощью шерстяной нити 30 мг.

Если при второй фиксации получена слабая, но отчетливая розовая окраска, то предполагается наличие кислого красителя.

При необходимости для более точного определения проводят новые фиксации-элюирования (до 4 или 5) по методике, идентичной той, что применялась для второй фиксации, до получения бледной, но отчетливой розовой окраски.

4.2.2 Определение характеристик методом тонкослойной хроматографии.

Пробку из цветной шерсти обрабатывают кипячением с 10 мл дистиллированной воды и несколькими каплями гидроксида аммония

(ρ_{20} = 0.92 г/мл). Восстанавливают кусок шерсти после отжима. Концентрируют раствор гидроксида аммония до 0.5 мл.

Помещают 20 мкл этого раствора на целлюлозной пластине в пределах 3 см от бокового края и 2 см от нижнего края пластины.

Ставят пластину на место в емкости так, чтобы нижний край был погружен в растворитель на глубину 1 см.

Когда поверхность растворителя покроет площадь 15–20 см пластины, вынимают пластину из резервуара и дают высохнуть на воздухе.

Идентифицируют краситель с помощью известных растворов искусственных красителей, нанесенных одновременно на хроматограмму.

БИБЛИОГРАФИЯ

TERCERO C., *F.V., O.I.V.,* 1970, n° 356.
ARATA P., SAENZ-LASCANO-RUIZ, Mme I., *F.V., O.I.V.,* 1967, n° 229.

Метод OIV-MA-AS315-09 Метод IV типа

Диэтиленгликоль
(2-гидрокси- этоксиэтанол)

1. Цель

Обнаружение диэтиленгликоля $HOCH_2CH_2OCH_2CH_2OH$ в вине, где его концентрация равна или превышает 10 мг/л.

2. Сущность метода

Отделение диэтиленгликоля от других компонентов вина с помощью газовой хроматографии с использованием капиллярной колонки после экстракции эфиром.

Примечание: Рабочие условия, описанные ниже, приведены в качестве примера.

3. Используемое оборудование

3.1 Газовый хроматограф, оснащенный следующим оборудованием:

- Инжектор для ввода проб с делением/без деления потока,
- пламенно-ионизационный детектор,
- капиллярная колонка, покрытая пленкой из полиэтиленгликоля (Carbowax 20 M), 50 м x 0,32 мм внутр. диам.

Условия эксплуатации:

Температура инжектора: 280°C
Температура детектора: 270°C.
Газ-носитель: водород.
Скорость потока газа-носителя: 2 мл/мин. Скорость потока: 30 мл/мин.
Впрыск: безраздельный.
Объем инъекции: 2 мкл.
Инжекция 35°C - поток должен быть перекрыт через 40 секунд.
Температурная программа: от 120°C до 170°C со скоростью 3°C/мин.

3.2 Центрифуга

4. Реактивы

4.1 1,3-пропандиол, 1 г/л, в алкоголе, 20% (об./об.), (внутренний стандарт).

4.2 Водный раствор диэтиленгликоля 20 мг/л.

5. Проведение исследования

В колбу объемом 50 мл помещают:

- 10 мл вина
- 1 мл раствора 1,3-пропандиола
- 25 мл диэтилового эфира.

Встряхивают и добавляют достаточное количество нейтрального карбоната калия для насыщения смеси. Встряхивают. Разделяют две фазы центрифугированием.

Проводят вторую экстракцию. Удаляют диэтиловый эфир выпариванием и восстанавливают остаток с помощью 5 мл этанола.

Объем вещества, полученного в результате экстракции, должен быть не менее 90%.

Проводят хроматографию в соответствии с условиями, указанными в 3.1.

6. Результаты

Диэтиленгликоль идентифицируют, сравнивая время его удерживания со временем эталонного раствора, анализируемого в тех же условиях, что и вино.

Количество определяется путем сравнения с эталонным раствором с использованием метода внутреннего стандарта.

Если концентрация равна или меньше 20 мг/л, рекомендуется подтверждение наличие диэтиленгликоля с помощью масс-спектрометрии.

БИБЛИОГРАФИЯ

BANDION F., VALENTA M. & KOHLMANN H., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe und Wein,* 1985, **35,** 89.

BERTRAND A., *Conn. vigne vins*, 1985, **19,** 191.

Laboratoire de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité de Montpellier, *F.V., O.I.V.,* 1986, n° 807.

Метод OIV-MA-AS315-10 Метод II типа

Измерение охратоксина А в вине после прохождения через иммуноаффинную колонку и HPLC с флуоресцентным детектированием

(Оэно 16/2001, с поправками Оэно 349-2011)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

В этом документе описан метод определения охратоксина А (ОТА) в красных, розовых и белых винах, включая специальные вина, в концентрациях равных / выше 10 мкг/л с использованием иммуноаффинной колонки и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) [1].

Этот метод был утвержден во время международного совместного исследования, в котором ОТА измерялись в белых и красных винах во время анализа вин, загрязненных естественным путем, и вин с токсинами в диапазоне от 0.01 мкг/л до 3.00 мкг/л.

Этот метод может применяться к полуигристым винам и игристым винам, если образцы предварительно дегазированы, например, с помощью ультразвука.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Образцы вина разбавляют раствором, содержащим полиэтиленгликоль и гидрокарбонат натрия. Этот раствор фильтруют и очищают на иммуноаффинной колонке.

ОТА элюируют метанолом и количественно определяют с помощью HPLC в инверсном состоянии с флуориметрическим детектированием.

3. РЕАКТИВЫ

3.1 Реактивы для разделения ОТА на иммуноаффинной колонке

Перечисленные ниже реактивы являются примерами. Поставщики иммуноаффинных колонок могут предлагать растворы для разбавления и элюенты, наиболее подходящие для их продуктов. Таким образом, предпочтительнее использовать рекомендуемые ингредиенты.

3.1.1 Дигидрат гидрофосфата натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) CAS [10028-24-7]
3.1.2 Моногидрат дигидрофосфата натрия ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) CAS [10049-21-5]
3.1.3 Хлорид натрия (NaCl) CAS [7647-14-5]
3.1.4 Очищенная вода для лабораторий, например соответствующая стандарту качества EN ISO 3696 (вода для аналитических лабораторных исследований – Спецификация и метод тестирования [ISO 3696:1987]).
3.1.5 Фосфатный буфер (раствор для разведения)
Растворяют 60 г дигидрата гидрофосфата натрия (3.1.1) и 8.8 г моногидрата дигидрофосфата натрия (3.1.2) в 950 мл воды и добавляют еще воды, чтобы объем раствора достиг 1 литра.
3.1.6 Фосфатный буферный раствор (промывочный раствор)
Растворяют 2.85г дигидрата гидрофосфата натрия (3.1.1), 0.55г моногидрата дигидрофосфата натрия of (3.1.2) and 8.7г NaCl в 950мл воды и добавляют еще воды, чтобы объем раствора достиг 1 литра.
3.1.7 Метанол (CH_3OH) CAS [67-56-1]

3.2 Реактивы для HPLC
3.2.1 Ацетонитрил для HPLC (CH_3CN) CAS [75-05-8]
3.2.2 Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH) CAS [64-19-7]
3.2.3 Подвижная фаза: вода: ацетонитрил: ледяная уксусная кислота, 99:99:2 (об./об.).
Смешивают 990 мл воды с 990 мл ацетонитрила (3.2.2) и 20 мл ледяной уксусной кислоты (3.2.3). При наличии нерастворенных компонентов фильтруют через фильтр 0,45 мкм. Дегазируют, (например, гелием), если используемое оборудование для HPLC не включает стадию дегазации.
3.3 Реактивы для приготовления базового раствора ОТА
3.3.1 Толуол ($C_6H_5CH_3$) CAS [108-88-3]
3.3.2 Смесь растворителей (толуол: ледяная уксусная кислота, 99:1, об./об.).
Смешивают 99 объемных частей толуола (3.3.1) с одной объемной частью ледяной уксусной кислоты (3.2.2).

3.4 Базовый раствор ОТА
Растворяют 1 мг ОТА в колбе, или если ОТА был получен в виде пленки после выпаривания, в смеси растворителей (3.12), чтобы получить раствор, содержащий примерно 20–30 мкг/мл ОТА.

Для определения точной концентрации записывают спектр поглощения между 300 и 370 нм в кварцевой камере с оптическим путем 1 см, используя смесь растворителей (3.12) в качестве контрольного образца. Определяют максимальный показатель поглощения и рассчитывают концентрацию ОТА (c) в мкг/мл, используя следующее уравнение:

$$c = A_{max} \times M \times 100 / \varepsilon \times \delta$$

В котором:

A_{max} = поглощение, определяемое самой длинной максимальной волной (около 333 нм).

M = молекулярная масса ОТА = 403,8 г/моль

ε = молярный коэффициент экстинкции ОТА в смеси растворителей (3.12)

ε = 544/моль

δ = оптический путь (см)

Этот раствор стабилен при температуре -18°C не менее 4 лет.

3.5 Стандартный раствор ОТА (2 мкг/мл в толуоле: уксусной кислоте, 99:1, об./об.)

Разбавляют базовый раствор (3.13) смесью растворителей (3.12) для получения стандартного раствора ОТА с концентрацией 2 мкг/мл.

Этот раствор можно хранить при температуре +4°C в холодильнике. Стабильность раствора следует регулярно проверять.

4. АППАРАТУРА

Стандартное лабораторное оборудование и, в частности, следующее оборудование:

4.1 Стеклянные пробирки (4 мл)

4.2 Вакуумный насос для приготовления иммуноаффинных колонок.

4.3 Резервуар и проточная трубка, адаптированные к иммуноаффинным колонкам.

4.4 Фильтры из стекловолокна (например, Whatman GF/A).

4.5 Иммуноаффинные колонки специально для ОТА.

Колонка должна иметь общую пропускную способность не менее 100 нг ОТА. Это обеспечит уровень очистки не менее 85% при пропускании разбавленного раствора вина, содержащего 100 нг ОТА.

4.6 Ротационный испаритель

4.7 Жидкостная хроматография, насос, способный достигать постоянного потока 1 мл/мин в изократическом режиме, с подвижной фазой.

4.8 Инъекционная система должна быть оснащена петлей на 100 мкл.

4.9 Колонка для аналитической HPLC из стали 150 x 4,6 мм (внутренний диаметр), заполненная стационарной фазой C_{18} (5 мкм), с предколонкой или предварительным фильтром (0,5 мкм), содержащим соответствующую фазу. Можно использовать колонки разного размера при условии, что они гарантируют качественную базовую линию и уровень фонового шума, позволяющие зафиксировать, среди прочего, пики ОТА.

4.10 Детектор флуоресценции подсоединяют к колонке, а длину волны возбуждения устанавливают на 333 нм, а длину волны эмиссии — на 460 нм.

4.11 Информационно-поисковая система

4.12 У.Ф. спектрометр

5. Проведение исследования

5.1 Приготовление образцов

Наливают 10 мл вина в коническую колбу объемом 100 мл. Добавляют 10 мл раствора для разведения (3.8). Энергично перемешивают. Фильтруют через фильтр из стекловолокна (4.4). Фильтрация необходима для мутных растворов или при выпадении осадка после растворения.

5.2 Очистка на иммуноаффинной колонке

Устанавливают иммуноаффинную колонку (4.5) на вакуумный насос (4.2) и присоединяют резервуар (4.3).

Добавляют 10 мл (эквивалентно 5 мл вина) разбавленного раствора в резервуар. Пропускают этот раствор через иммуноаффинную колонку со скоростью 1 капля в секунду. Иммуноаффинная колонка не должна высыхать. Промывают иммуноаффинную колонку 5 мл очищающего раствора (3.9), а затем 5 мл воды со скоростью 1–2 капли в секунду.

Высушивают колонку с помощь потока воздуха. Элюируют ОТА в стеклянной колбе (4.1), используя 2 мл метанола (3.4) со скоростью 1 капля в секунду. Выпаривают элюат досуха при 50°C, используя азот. Сразу же снова растворяют субстанцию в 250 мкл подвижной фазы HPLC (3.10) и выдерживают при 4°C до проведения анализа HPLC.

5.3 Анализ HPLC

Используя инъекционную петлю, вводят 100 мкл восстановленного экстракта (эквивалентного 2 мл вина) в хроматограф.

Условия эксплуатации

Поток: 1 мл/мин.

Подвижная фаза: ацетонитрил: вода: ледяная уксусная кислота (99:99:2, об./об./об.)

Детектор флуоресценции: Длина волны возбуждения = 333 нм
Длина волны излучения = 460 нм

Объем инъекции: 100 мкл

6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОХРАТОКСИНА А (ОТА)

Количественное определение ОТА следует рассчитывать путем измерения площади или высоты пиков во время удерживания ОТА и сравнения с калибровочной кривой.

6.1 Калибровочная кривая

Готовят калибровочную кривую ежедневно и каждый раз при изменении хроматографических условий. Берут 0,5 мл стандартного раствора ОТА (3.14) с концентрацией 2 мкг/мл в стеклянной колбе и выпаривают растворитель с помощью азота.

Снова растворяют в 10 мл подвижной фазы HPLC (3.10), предварительно отфильтрованной с использованием фильтра 0,45 мкм. Это позволит Вам получить раствор ОТА 100 нг/мл.

1. Готовят 5 калибровочных растворов для HPLC в пяти градуированных колбах объемом 5 мл в соответствии с таблицей 1.

Дополняют каждый стандартный раствор объемом 5 мл подвижной фазой для HPLC. (3.10).

Вводят 100 мкл каждого раствора в HPLC.

Таблица 1

	Ст. 1	Ст. 2	Ст. 3	Ст. 4	Ст. 5
мкл отфильтрованной подвижной фазы HPLC (3.10)	4970	4900	4700	4000	2000
мкл раствора ОТА с концентрацией	30	100	300	1000	3000
Концентрация ОТА (нг/мл)	0.6	2.0	6.0	20	60
Введенный ОТА (нг)	0.06	0.20	0.60	2.00	6.00

ПРИМЕЧАНИЕ
.

1. Если количество ОТА в образцах выходит за пределы диапазона калибровки, следует провести соответствующее разбавление или ввести меньшие объемы. В этих случаях окончательный вариант (7) следует пересматривать в каждом конкретном случае.

2. *Из-за больших различий в концентрациях рекомендуется пройти линейную калибровку по нулю, чтобы получить точное количественное определение для низких концентраций ОТА. (менее 0,1 мкг/л)*

7. РАСЧЕТЫ

Рассчитывают количество ОТА в аликвоте тестовых растворов ив растворах, введенных в колонку HPLC

Рассчитывают концентрацию ОТА (C_{OTA}) в нг/мл (эквивалентно мкг/л) по следующей формуле:

$C_{OTA} = M_A$ u F/V_1 u V_3/V_2

Где:

M_A представляет собой объем охратоксина А (в нг) в аликвотной части образца, введенного в колонку и оцененного по калибровочной кривой.

F - коэффициент разбавления

V_1 - объем анализируемой пробы (10 мл).

V_2 - объем тестируемого раствора, введенного в колонку (100 мкл)

V_3 объем раствора, использованный для растворения сухого элюата (250 мкл)

8. ПОКАЗАТЕЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭТОГО МЕТОДА В ЛАБОРАТОРИЯХ

В Таблице 2 собраны результаты применения метода к белым, розовым и красным винам в лабораториях, участвовавших в валидации этого метода.

Таблица 2. Извлечение охратоксина А из вин, в которые был добавлен охратоксин А в разных концентрациях

	Красное вино		Розовое вино		Белое вино	
Добавление (мкг/л)	Выход± SD* (%)	RSD# (%)	Выход ± SD* (%)	RSD# (%)	Выход± SD* (%)	RSD# (%)
0.04	96.7 ± 2.2	2.3	94.1 ± 6.1	6.5	91.6 ± 8.9	9.7
0.1	90.8 ± 2.6	2.9	89.9 ± 1.0	1.1	88.4 ± 0.2	0.2
0.2	91.3 ± 0.6	0.7	88.9 ± 2.1	2.4	95.1 ± 2.4	2.5
0.5	92.3 ± 0.4	0.5	91.6 ± 0.4	0.4	93.0 ± 0.2	0.2
1.0	97.8 ± 2.6	2.6	100.6 ± .,5	2.5	100.7 ± 1.0	1.0
2.0	96.5 ± 1.6	1.7	98.6 ± 1.8	1.8	98.0 ± 1.5	1.5
5.0	88.1 ± 1.3	1.5	-	-	-	-
10,0	88,9 ± 0,6	0,7	-	-	-	-
Среднее значение	92.8 ± 3.5	3.8	94.5 ± 5.2	5.5	94.5 ± 4.1	4.3

* SD = Стандартное отклонение (n = 3 повторения);

RSD = Относительное стандартное отклонение (в процентах).

9. ГРУППОВАЯ РАБОТА

Метод был подтвержден групповым исследованием с участием 16 лабораторий в 8 странах, следуя рекомендациям по протоколу, согласованным для проверки методов анализа. [2]. Каждый участник проанализировал 10 белых вин, 10 красных вин, по 5 случайно выбранных вин в двух экземплярах каждое; с естественным загрязнением или с добавлением ОТА. Характеристики метода, полученные в результате этой работы, приведены в приложениях I и II, а критические точки метода описаны в приложении III.

10. УЧАСТВОВАВШИЕ ЛАБОРАТОРИИ

Unione Italiana Vini, Verona	ИТАЛИЯ
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti	ИТАЛИЯ
Istituto Tecnico Agraria, S. Michele all'Adige (TN)	ИТАЛИЯ
Università Cattolica, Piacenza	ИТАЛИЯ
Institute for Health and Consumer Protection, JRC – Ispra	ИТАЛИЯ
Neotron s.r.l., S. Maria di Mugnano (MO)	ИТАЛИЯ
Chemical Control s.r.l., Madonna dell'Olmo (CN)	ИТАЛИЯ
Laboratoire Toxicologie Hygiène Appliquée, Université V. Segalen, Bordeaux	ФРАНЦИЯ
Laboratoire de la D.G.C.C.R.F. de Bordeaux, Talence	ФРАНЦИЯ
National Food Administration, Uppsala	ШВЕЦИЯ
Systembolagets Laboratorium, Haninge	ШВЕЦИЯ
Chemisches Untersuchungsamt, Trier	ГЕРМАНИЯ
State General Laboratory, Nicosia	КИПР
Finnish Customs Laboratory, Espoo	ФИНЛЯНДИЯ
Central Science Laboratory, York	ВЕЛИКОБРИТАНИЯ
E.T.S. Laboratories, St. Helena, CA	США

11. БИБЛИОГРАФИЯ

[1] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze. *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 864 (1999) 89-101.[

2] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Следующие данные были получены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с рекомендациями согласованного протокола для совместных исследований с целью валидации метода анализа.

БЕЛОЕ ВИНО		Добавленный ОТА (мкг/л)			
Образец	Белы	0.100	1.100	2.000	n.c.
Год межлабораторных испытаний	1999	1999	1999	1999	1999
Количество лабораторий	9	16	16	16	16
Количество лабораторий, оставшихся после исключения некорректных результатов	16	13*	14	14	15
Количество исключенных лабораторий	14*	1	2	2	1
Количество принятых результатов		26	28	28	30
Среднее значение (мкг/л)	<0,01	0,102	1,000	1,768	0,283
Стандартное отклонение/повторяемость (мкг/л)	-	0.01	0.07	0.15	0.03
Относительное стандартное отклонение /повторяемость (%)	-	10.0	6.6	8.5	10.6
Предел повторяемости r (мкг/л)	-	0.028	0.196	0.420	0.084
Стандартное отклонение / воспроизводимость Sr (мкг/л)	-	0.01	0.14	0.23	0.04
Относительное стандартное отклонение / воспроизводимость RSD_R (%)	-	14.0	13.6	13.3	14.9
Предел воспроизводимости R (мкг/л)	-	0.028	0.392	0.644	0.112
Выход экстракции %	-	101.7	90.9	88.4	-

** 2 лаборатории были исключены из статистической оценки из-за высокого предела обнаружения (= 0,2 мкг/л).*

n.c. = образец загрязнен естественным путем

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Следующие данные были получены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с рекомендациями согласованного протокола для совместных исследований с целью валидации метода анализа.

КРАСНОЕ ВИНО		Добавленный ОТА (мкг/л)			
Образцы	White	0.200	0.900	3.000	n.c.
Год межлабораторных испытаний	1999	1999	1999	1999	1999
Количество лабораторий	15	15	15	15	15
Количество лабораторий, оставшихся после исключения некорректных результатов	14*	12*	14	15	14
Количество исключенных лабораторий	-	2	1	-	1
Количество принятых результатов	28	24	28	30	28
Среднее значение (мкг/л)	<0.01	0.187	0.814	2.537	1.693
Стандартное отклонение/повторяемость (мкг/л)	-	0.01	0.08	0.23	0.19
Относительное стандартное отклонение /повторяемость (%)	-	5.5	9.9	8.9	10.9
Предел повторяемости r (мкг/л)	-	0.028	0.224	0.644	0.532
Стандартное отклонение / воспроизводимость Sr (мкг/л)	-	0.02	0.10	0.34	0.23
Относительное стандартное отклонение / воспроизводимость RSD_R (%)	-	9.9	12.5	13.4	13.4
Предел воспроизводимости R (мкг/л)	-	0.056	0.280	0.952	0.644
Выход экстракции %	-	93.4	90.4	84.6	-

** 1 лабораторияа была исключена из статистической оценки из-за высокого предела обнаружения (= 0,2 мкг/л).*

n.c. = образец загрязнен естественным путем

ПРИЛОЖЕНИЕ III

Руководство по критическим точкам метода измерения охратоксина А с помощью иммуноаффинной колонки, тип II.

Критические точки для наблюдения перечислены ниже только для информационных целей и являются руководством по применению метода.

1. Область применения

Только в информационных целях метод может применяться к виноградному суслу, частично сброженному виноградному суслу и молодым винам, находящимся в процессе брожения. Параметры валидации касаются только вин.

2. Сущность метода

Метод разбит на два этапа. Первый этап включает очистку и концентрирование OTA в вине или сусле путем захвата на иммуноаффинной колонке с последующим элюированием. Второй этап включает количественную оценку элюата с помощью HPLC с использованием флуоресцентной детекции.

3. Реактивы

3.4 Стандартный раствор OTA
Использование OTA в твердой форме не рекомендуется; рекомендуется использовать стандартный раствор OTA (пункт 3.5)

3.5 Стандартный раствор OTA
Использование коммерческого раствора стандартной концентрации (около 50 мкг/мл) с сертификатом анализа, в котором указаны референтные значения и неопределенность концентрации.
Теоретически объем этих растворов не сертифицирован, и их необходимо отбирать сертифицированными пипетками, чтобы получить маточные растворы от 0,25 до 1 мг/л в чистом этаноле или в подвижной

фазе методом HPLC (см. 3.2.3). Этот раствор стабилен при температуре -18°C не менее 4 лет.

4. Оборудование

4.13 РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОАФФИННЫХ КОЛОНОК (опционально)

Этап концентрации на иммуноаффинной колонке является основным источником неточности в методе анализа. Опыт показывает, что различные колонки, предлагаемые на рынке, могут иметь степень извлечения от 70 до 100%.
Поэтому перед использованием рекомендуется проверить производительность партии колонок. Этот шаг рекомендуется в случае изменения поставщиков или моделей колонок.

4.13.1 Характеристика партии колонок (показатель степени извлечения): Выбирают около 10 колонок, представляющих типы колонок, обычно используемых в лаборатории, и все из разных серий поставок. Готовят такое же количество вин, представляющих разные матрицы, с нулевой концентрацией OTA, с известными добавками x_i от 0.5 до 2 мкг/кг$^{-1}$.

После внесения добавок быстро анализируют эти n образцов с помощью партии выбранных колонок. Пусть y_i — найденные значения. Рассчитываются данные скорости извлечения, при этом скорость представляет собой измеренное количество по отношению к известному добавленному количеству.

$$t_i = \frac{y_i}{x_i}$$ *(степень извлечения колонки i)*

$$T = \frac{\sum t_i}{n}$$ *(средняя степень извлечения)*

$$S_t = \sqrt{\frac{\sum (t_i - T)^2}{n-1}}$$ *(стандартное отклонение степени извлечения)*

Стандартное отклонение степени извлечения, рассчитанное таким образом, представляет собой не только вариативность степени извлечения колонок, но также стандартную погрешность системы измерения, применяемой после использования колонок (HPLC). Тем не менее, можно установить разумную оценку стандартного отклонения показателя восстановления колонок путем вычитания стандартной погрешности системы HPLC из рассчитанной ошибки в показателе восстановления:

- Оценивают стандартную неопределенность S_v (выраженную в виде стандартного отклонения) системы измерения в строгом смысле этого слова (без учета шага иммуноаффинной колонки).
Для этого можно использовать исследование точности решений ОТА.

Стандартное отклонение коэффициента извлечения Sp оценивается следующим образом:

$$S_P = \sqrt{S_t^{\,2} - S_v^{\,2}}$$

Для достаточно широкого диапазона концентраций предпочтительнее выражать это значение как коэффициент вариации стандартного отклонения (RSDR).

CV% = Sp • 100/концентрация добавок

5. Проведение исследования

Процедура, описанная в пункте 5, является примером. Состав растворов для разбавления и промывки может различаться у разных производителей колонок. Точно так же концентрация разбавленного образца вина может быть скорректирована по мере необходимости.

6. Количественное определение охратоксина А (ОТА)

6.1 Калибровочная кривая
Готовят калибровочную кривую ежедневно или каждый раз при изменении условий хроматографии. Готовят кривую, используя

растворы, полученные путем разведения исходного раствора в подвижной фазе (см. 3.2.3). Выбранные значения должны обеспечивать рабочий диапазон с учетом коэффициента концентрации вина.

Метод OIV-MA-AS315-11 Метод II типа

HPLC-определение девяти основных антоцианов в красном и розовом вине

(Резолюция Oeno 22/2003 с правками Oeno 12/2007)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Аналитический метод касается определения относительного состава антоцианов в красном и розовом вине. Разделение проводят с помощью HPLC с обращенной фазой и детектированием в УФ-видимой области.

Аналитический метод касается определения относительного состава антоцианов в красном и розовом вине. Разделение проводят методом HPLC с обращенной фазой. Многие авторы [3, 6-17] опубликовали данные по антоциановому составу красных вин с использованием аналогичных аналитических методов. Например, Вульф и др. [18] обнаружили и идентифицировали 21 антоциан, Хейер и др. [13] около 40 методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Состав антоцианов может быть очень сложным, поэтому необходима простая процедура. Следовательно, этот метод определяет только основные соединения всей антоциановой фракции.

Государствам-участникам проекта рекомендуется продолжать исследования в этой области, чтобы избежать любой ненаучной оценки результатов.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Разделение пяти наиболее важных неацилированных антоцианов (см. рис. 1, пики 1–5) и четырех основных ацилированных антоцианов (см. рис. 1, пики 6–9). Анализ красного и розового вина прямым разделением методом HPLC с использованием колонки с обращенной

фазой с градиентным элюированием водой/муравьиной кислотой/ацетонитрилом с детектированием при 518 нм [1.2]

3 РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Муравьиная кислота (98 %) (CAS № 64-18-6);
Вода, подходящая для HPLC;
Ацетонитрил, подходящий для HPLC (CAS № 75-08-8);
Растворители для HPLC:
Растворитель A: вода/муравьиная кислота/ацетонитрил 87 : 10 : 3 (об./об./об.)
Растворитель B: вода/муравьиная кислота/ацетонитрил 40 : 10 : 50 (об./об./об.)
Мембранный фильтр для дегазации растворителя HPLC и для подготовки проб к анализу.

Референтные продукты для идентификации пиков.
HPLC-анализ антоцианов в вине выполнить сложно из-за отсутствия в продаже доступных чистых продуктов. Кроме того, антоцианы крайне нестабильны в растворе. Возможно приобрести следующие антоциановые пигменты:
Цианидол-3-глюкозид (также куроманин хлорид); M = 484,84 г/моль
Пеонидол-3-глюкозид; M = 498,84 г/моль
Мальвидол-3-глюкозид (также онинхлорид); M = 528,84 г/моль
Мальвидол-3,5-диглюкозид (также мальвинхлорид); M = 691,04 г/моль

4. ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

HPLC-система с:
бинарным градиентным насосом, системой ввода проб объемом от 10 до 200 мкл
детектор с диодной матрицей или УФ-детектор с видимым диапазоном, интегратор или компьютер с программным обеспечением для сбора данных, печь для нагрева колонки при 40°C,
система дегазации растворителя, аналитическая колонка, например:

LiChrospher 100 RP 18 (5 мкм) в защитной колонке LiChroCart 250-4 : например 18 (30-40 мм) в картридже диаметром 2 мм и длиной 20 мм.

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1 Подготовка образцов

Чистые вина разливаются непосредственно без какой-либо подготовки в виалы для проб автодозатора. Мутные образцы фильтруют с использованием мембранного фильтра 0.45 мкм для подготовки образцов для HPLC. Первую часть фильтрата не стоит использовать. Поскольку диапазон линейности абсорбции в зависимости от концентрации антоцианов велик, можно регулировать объемы впрыска от 10 до 200 мкл в зависимости от интенсивности цвета вина. Существенной разницы между результатами, полученными для разных объемов инъекции, не наблюдалось.

5.2 Анализ

Условия для проведения HPLC
Анализ HPLC проводят в следующих условиях:

Вводимый объем:	от 50 мкл (красное вино) до 200 мкл (розовое вино)
Поток:	0,8 мл/мин.
Температура:	40°C
Время работы:	45 минут
Время постобработки:	5 минут
Детектирование:	518 нм

Градиентное элюирование: Время (мин)	Раствор A % (об./об.)	Раствор B % (об./об.)

0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

Для проверки эффективности колонки число теоретических плато (N), рассчитанное по мальвидол-3-глюкозиду, не должно быть ниже 20 000, а разрешение (R) между пеонидол-3-кумарилглюкозидом и мальвидолин-3-кумарилглюкозидом не должно быть ниже 1.5. При значениях ниже вышеуказанных рекомендуется использовать новую колонку.

Типичная хроматограмма представлена на рисунке 1,
где разделены следующие антоцианы:

		№ пика
Группа 1: Неацилированные антоцианидин-3-глюкозиды:	дельфинидол-3-глюкозид	1
	цианидол-3-глюкозид	2
	петунидол-3-глюкозид	3
	пеонидол-3-глюкозид	4
	мальвидол-3-глюкозид	5
Группа 2: Ацилированные антоцианидин-3-глюкозиды:	пеонидол-3-ацетилглюкозид	6
	мальвидол-3-ацетилглюкозид	7
Группа 3: Кумарилированные антоцианидин-3-глюкозиды:	пеонидол-3-кумарилглюкозид	8
	мальвидол-3-кумарилглюкозид	9

6. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Необходимо обратить внимание, что значения выражены как относительные количества суммы девяти антоцианов, определенных в этом методе.

7. ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ И ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Предел обнаружения (LD) и предел количественного определения (LQ) оцениваются в соответствии с инструкциями в резолюции OENO 7-2000 «Оценка пределов обнаружения и количественного определения метода анализа».

Для этой цели часть хроматограммы берется в расширенном виде, охватывая диапазон десятикратной ширины средней высоты ($w_{½}$) пика, соответствующего антоцианину. Кроме того, рисуются две параллельные линии, которые охватывают максимальную амплитуду сигнального окна. Расстояние между этими двумя линиями дает h_{max}, выраженное в миллиединицах поглощения. (mAU).

Предел обнаружения (LD) и предел количественного определения (LQ) зависят от индивидуальных условий измерения химического анализа и должны быть определены пользователем метода. В приложении приводится пример такого определения со следующими результатами:

h_{max} = 0,208 [mAU]; LD = 3 x 0,208 [mAU] = 0,62 [mAU].
LQ = 10 x 0, 208 [mAU] = 2,08 [mAU].

Рекомендации:

С объединенными данными из всего состава антоцианов, такими как сумма ацилированных антоцианов или отношение ацетилированных к кумарилированным антоцианам, расчет не должен выполняться в случаях, когда один из компонентов имеет показатели ниже предела количественного определения (LQ).

С другой стороны, измерения ниже предела количественного определения (LQ) не лишены информативности и могут вполне соответствовать цели [1].

Библиография:

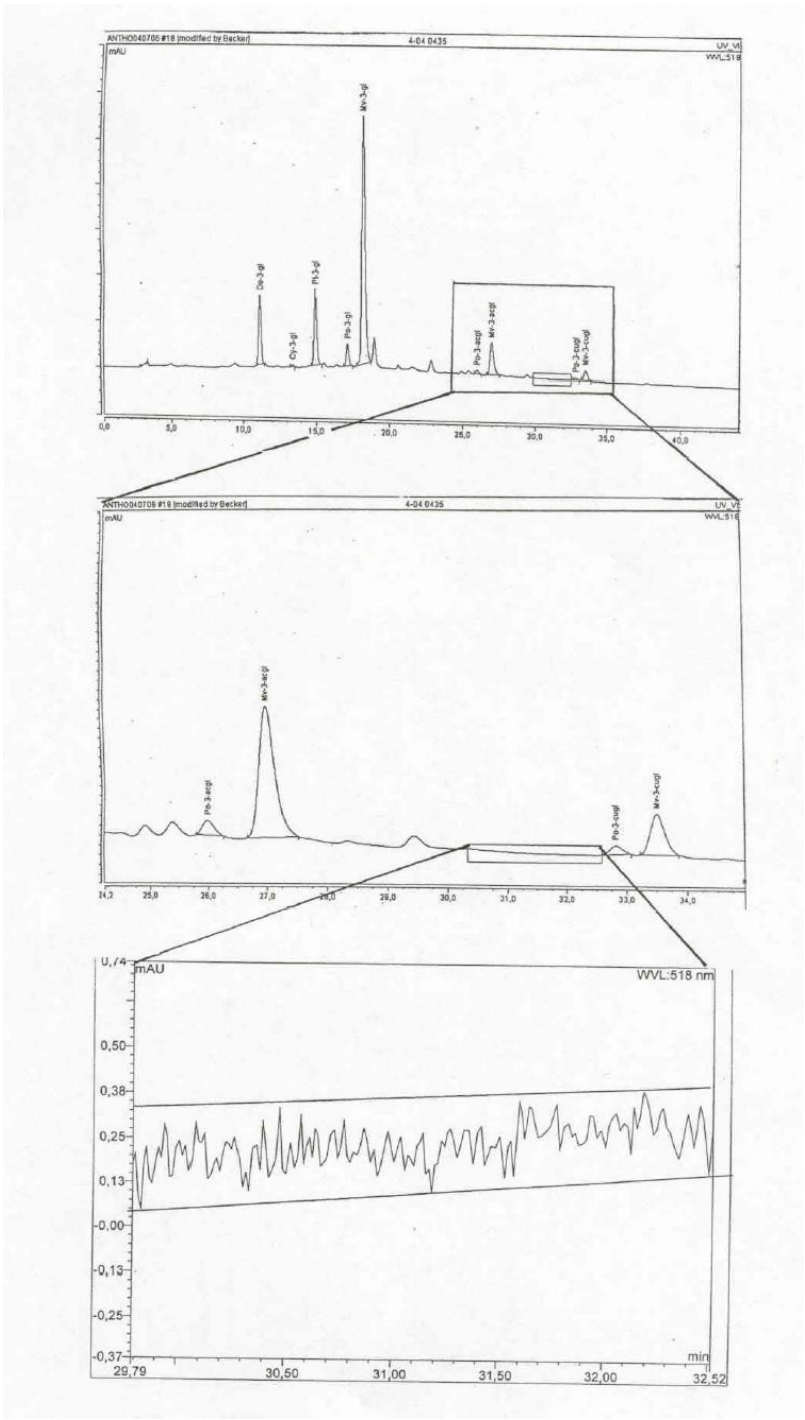
[1] Thompson, M.; Ellison, S.L.R. ; Wood, R., Harmonized Guidelines for Single- Laboratory Validation of Methods of Analysis, Pure Appl. Chem. (2002) 74: 835-
855

8. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТОЧНОСТИ МЕТОДА

Значения повторяемости (r) и воспроизводимости (R) для девяти антоцианов приведены в таблице 2 и зависят от величины площади пика. Погрешность измерения площади конкретного пика определяется значением r и R, которое соответствует ближайшему значению, указанному в таблице 2

Значения, составленные из проверочных данных, можно рассчитать, следуя соответствующим статистическим правилам. Для расчета

общей погрешности (sr), например, для суммы ацетилированных антоцианов и отклонения (sr2) удельной общей погрешности, общую погрешность коэффициента отношения, например, ацетилированных и кумарилированных антоцианов, необходимо ввести в расчеты квадрат относительной погрешности (=sr/ai). Используя эти правила, можно рассчитать все точные значения, используя данные в таблице 2.


mAU
WVL:518 nm
0,50
0,38
0,25
0,13
-0,00
-0,13
-0,25
-0,37
29,79
30,50
31,00
31,50
32,00
32,52
min

Приложеиие

Библиография

[1] Marx, R., B. Holbach, H. Otteneder; Determination of nine characteristic Anthocyanins in Wine by HPLC; OIV, F.V.N° 1104 2713/100200

[2] Holbach, B., R. Marx, M. Ackermann; Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung von Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Lebensmittelchemie (**1997**) 51: 78 - 80

[3] Eder, R., S. Wendelin, J. Barna; Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. Mitt. Klosterneuburg (**1990**) 40: 68-75

[4] ISO-5725-2: **1994** "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility"

[5] Otteneder, H., Marx, R., Olschimke, D.; Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. O.I.V. F.V.N° 1130 (**2001**)

[6] Mattivi F.; Scienza, A.; Failla, O.; Vika, P.; Anzani, R.; Redesco, G.; Gianazza, E.; Righetti; P. Vitis vinifera - a chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. *Vitis (special issue)* **1990**, 119-133

[7] Roggero, I.P.; Larice, I.L.; Rocheville-Divorne, C.; Archier, P.; Coen, V. Composition Antocyanique des cepages. *Revue Francaise d'Oenologie* **1998**, *112,* 41-48

[8] Eder, R.; Wendelin, S; Barna, J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanin analysis. *Mitt. Klosterneuburg* **1994**, *44,* 201-212

[9] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *212,* 108-112

[1] Marx, R., B. Holbach, H. Otteneder; Determination of nine characteristic Anthocyanins in Wine by HPLC; OIV, F.V.N° 1104 2713/100200

[2] Holbach, B., R. Marx, M. Ackermann; Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung von Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Lebensmittelchemie (**1997**) 51: 78 - 80

[3] Eder, R., S. Wendelin, J. Barna; Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. Mitt. Klosterneuburg (**1990**) 40: 68-75

[4] ISO-5725-2: **1994** "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility"

[5] Otteneder, H., Marx, R., Olschimke, D.; Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. O.I.V. F.V.N° 1130 (**2001**)

[6] Mattivi F.; Scienza, A.; Failla, O.; Vika, P.; Anzani, R.; Redesco, G.; Gianazza, E.; Righetti; P. Vitis vinifera - a chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. *Vitis (special issue)* **1990**, 119-133

[7] Roggero, I.P.; Larice, I.L.; Rocheville-Divorne, C.; Archier, P.; Coen, V. Composition Antocyanique des cepages. *Revue Francaise d'Oenologie* **1998**, *112,* 41-48

[8] Eder, R.; Wendelin, S; Barna, J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanin analysis. *Mitt. Klosterneuburg* **1994**, *44,* 201-212

[9] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *212,* 108-112

[10] Garcia-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin pattern of

several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 32-37

[11] Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M.J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, K.; Casp, A. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *214*, 313-309

[12] Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martin-Ortega, G.; Ryan, J-M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr A* **2001**, *915*, 53-60

[13] Heier, A.; Blaas, W.; Droß, A.; Wittkowski, R.; Anthocyanin Analysis by HPLC/ESI-MS, Am.J.Enol.Vitic, **2002**, 53, 78-86

[14] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *J. Sci. Food Agric*, **2000**, *80*, 1909-1917

[15] Anonymous. Bekanntmachung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz,* **2001**, *44*, 748

[16] Burns, I.; Mullen, W.; Landrault, N.; Teissedre, P.-L.; Lean, M.E.I.; Crozier, A. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4096-4102

[17] Otteneder, H.; Holbach, B.; Marx, R.; Zimmer, M. Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthocyanspektrum. *Mitt. Klosterneuburg*, **2002**, *52*, 187-194

[18] L.W. Wulf and C.W. Nagel; High-Pressure liquid chromatographic separation of Anthocyanins of Vitis vinifera. Am.J.Enol.Vitic **1978**, 29, 42-49

Приложение B

Статистические результаты

Изучение и оценка эффективности метода

17 лабораторий из 5 европейских стран приняли участие в валидационном исследовании метода при координации Официальной государственной лаборатории пищевой химии Германии в Трире. Участники перечислены в таблице 3. Пример хроматограммы представлен на рисунке 1, а подробные результаты приведены в таблице 2.

Статистическая оценка проводилась в соответствии с резолюцией 6/99 и стандартом ISO 5725-1944 [4.5].

Хроматограммы, отправленные вместе с таблицами результатов, соответствовали всем требованиям, предъявляемым к характеристикам аналитической колонки. Ни одна лаборатория не должна была быть полностью исключена из исследования, например, из-за неправильной идентификации пика.

Значения выбросов были найдены с использованием тестирования выбросов Диксона и Граббса в соответствии с процедурой «Гармонизированного протокола - IUPAC 1994» и Резолюцией OIV OENO 19/2002. Значения sr, sR, r и R были рассчитаны для 9 основных антоцианов при 5 уровнях содержания. Для аналитических результатов следует использовать значения ближайших уровней.

Чтобы получить общее представление о производительности метода, все собранные значения RSDR- и RSDR- сгруппированы по диапазонам областей в следующей таблице:

Таблица 1: Сводка результатов исследования эффективности метода

Диапазон относительных площадей пиков *[%]	**Диапазон RSD_r [%]**	**Диапазон RSD_R [%]**
>0.4 ± 1.0	6.8 - 22.4	20.6 - 50.9
>1.1 ± 1.5	4.2 - 18.1	11.8 - 28.1
>1.5 ± 3.5	2.1 ± 7.7	10.6 - 15.6
>3.5 ± 5.5	2.7 ± 5.7	18.7 ± 7.5
>5.5 ± 7.5	2.4 ± 3.9	6.5 - 10.0
>10 ± 14	1.1 ± 2.9	3.7 - 9.2
>14 ± 17	1.0 - 3.9	3.2 - 5.4
>50 ± 76	0.3 - 1.0	2.1 - 3.1
* независимый от антоцианов		

Это приводит к выводу, что повторяемость и воспроизводимость зависят от общей суммы относительных площадей пиков. Чем они выше, тем лучше RSDr и RSDR. Для содержания антоцианов близко к пределу обнаружения (например, цианидин-3-глюкозид) при небольших относительных площадях (менее 1%) значения RSDr et RSDR могут значительно возрастать. Для антоцианов, относительная площадь которых превышает 1%, значения RSDr и RSDR являются приемлемыми.

Рисунок 1: Разделение 9 антоцианов в красном вине

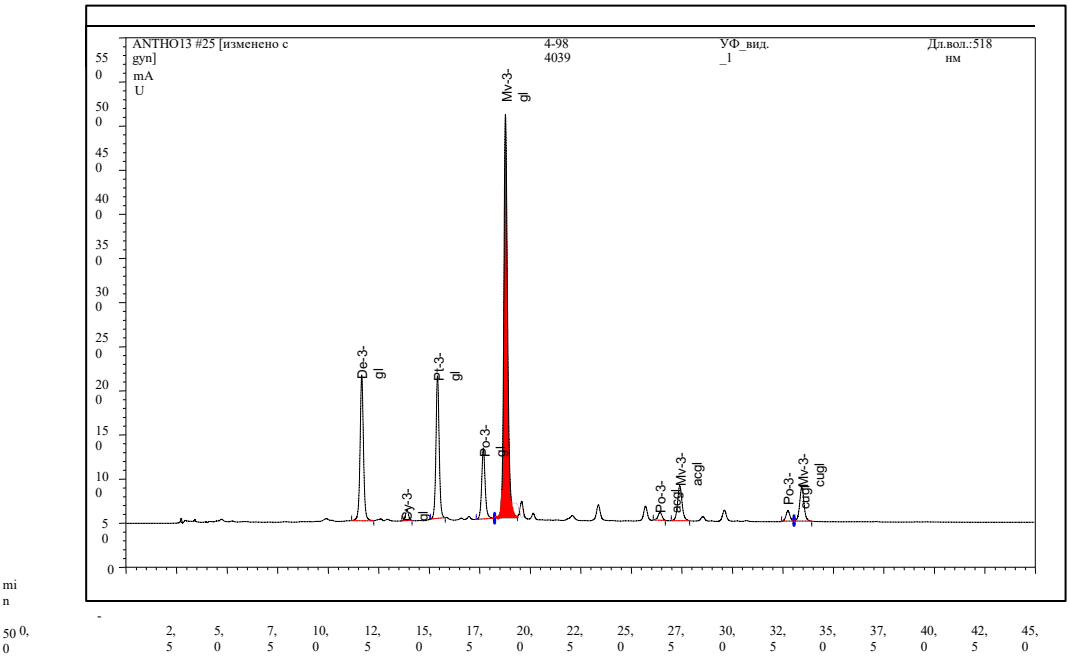


Таблица 2: Результаты исследования эффективности метода

Антоциан	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4	Образец 5
Делфинидол-3-глюкозид					
n	14	14	16	15	16
среднее	6.75	14.14	3.45	16.68	3.54
s_r	0.163	0.145	0.142	0.142	0.108
RSD_r(%)	2.4	1.0	4.1	0.8	3.1
r	0.46	0.41	0.40	0.40	0.30
s_R	0.544	0.462	0.526	0.704	0.490
RSD_R(%)	8.1	3.3	15.2	4.2	13.8
R	1.52	1.29	1.47	1.97	1.37
Цианидол-3-глюкозид					
n	16	17	16	15	14
среднее	2.18	1.23	0.61	1.46	0.34
s_r	0.086	0.053	0.043	0.110	0.031
RSD_r(%)	4.0	4.3	7.1	7.5	9.2
r	0.24	0.15	0.12	0.31	0.09
s_R	0.460	0.211	0.213	0.180	0.158
RSD_R(%)	21.2	17.2	34.9	12.3	46.7
R	1.29	0.59	0.60	0.50	0.44
Петунидол-3-глюкозид					
n среднее	15	17	16	14	15
s_r	10.24	14.29	5.75	12.21	6.19
RSD_r(%)	0.233	0.596	0.157	0.097	0.196
r	2.3	4.2	2.7	0.8	3.2
s_R	0.65	1.67	0.44	0.27	0.55
RSD_R(%)	0.431	0.996	0.495	0.469	0.404
R	4.2	7.0	8.6	3.8	6.5
	1.21	2.79	1.39	1.31	1.13
Пеонидол-3-глюкозид					
n	16	15	17	17	16
среднее	11.88	6.23	13.75	7.44	4.12
s_r	0.241	0.166	0.144	0.232	0.174
RSD_r(%)	2.0	2.7	1.0	3.1	4.2
r	0.68	0.47	0.40	0.65	0.49
s_R	0.981	0.560	1.227	0.602	0.532
RSD_R(%)	8.3	9.0	8.9	8.1	12.9
R	2.75	1.57	3.44	1.69	1.49
Мальвидол-3-глюкозид					
n	16	15	17	16	16
среднее	55.90	55.04	76.11	52.60	61.04
s_r	0.545	0.272	0.251	0.298	0.377
RSD_r(%)	1.0	0.5	0.3	0.6	0.6
r	1.53	0.76	0.70	0.83	1.06
s_R	2.026	2.649	2.291	1.606	1.986
RSD_R(%)	3.6	4.8	3.0	3.1	3.3
R	5.67	7.42	6.41	4.50	5.56

n	= количество лабораторий, оставшихся после устранения выбросов
s_r	= стандартное отклонение повторяемости
$RSD_r(\%)$	= относительное стандартное отклонение повторяемости
r	= предел повторяемости
s_R	= стандартное отклонение воспроизводимости
$RSD_R(\%)$	= относительное стандартное отклонение воспроизводимости
R	= предел воспроизводимости

Таблица 2: Результаты исследования эффективности метода

Антоциан	образец 1	образец 2	образец 3	образец 4	образец 5
Пеонидол-3-ацетилглюкозид					
n	14	16		14	16
среднее	1.16	1.44		0.59	3.74
s_r	0.064	0.062		0.059	0.215
RSD_r(%)	5.5	4.3		10.1	5.8
r	0.18	0.17		0.17	0.60
s_R	0.511	0.392		0.272	0.374
RSD_R(%)	43.9	27.2		46.4	10.0
R	1.43	1.10		0.76	1.05
Мальвидол-3-ацетилглюкозид					
n	16	17		17	16
среднее	5.51	4.84		3.11	15.07
s_r	0.176	0.167		0.088	0.213
RSD_r(%)	3.2	3.4		2.8	1.4
r	0.49	0.47		0.25	0.60
s_R	0.395	0.366		0.496	0.617
RSD_R(%)	7.2	7.6		16.0	4.1
R	1.11	1.02		1.39	1.73
Пеонидол-3-кумарилглюкозид					
n	16	14		17	16
среднее	1.26	0.90		0.89	1.32
s_r	0.130	0.046		0.060	0.058
RSD_r(%)	10.3	5.1		6.8	4.4
r	0.36	0.13		0.17	0.16
s_R	0.309	0.109		0.204	0.156
RSD_R(%)	24.5	12.2		23.0	11.8
R	0.86	0.31		0.57	0.44
Мальвидол-3кумарилглюкозид					
n	17	17		17	16
среднее	4.62	2.66		4.54	4.45
s_r	0.159	0.055		0.124	0.048
RSD_r(%)	3.4	2.1		2.7	1.1
r	0.45	0.15		0.35	0.13
s_R	0.865	0.392		0.574	0.364
RSD_R(%)	18.7	14.7		12.6	8.2
R	2.42	1.10		1.61	1.02

n = количество лабораторий, оставшихся после устранения выбросов
s_r = стандартное отклонение повторяемости
RSD_r(%) = относительное стандартное отклонение повторяемости
r = предел повторяемости
s_R = стандартное отклонение воспроизводимости
RSD_R(%) = относительное стандартное отклонение воспроизводимости
R = предел воспроизводимости

Таблица 3: Список участников

ABC Labor Dahmen, Mülheim/Mosel	**Г**
Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster	**Г**
Institut für Lebensmittelchemie Koblenz	**Г**
Institut für Lebensmittelchemie Speyer	**Г**
Institut für Lebensmittelchemie Trier	**Г**
Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittel Mainz	**Г**
Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach	**Г**
Labor Dr. Klaus Millies, Hofheim-Wildsachsen	**Г**
Labor Heidger, Kesten	**Г**
Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt	**Г**
Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau,	**Г**
Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt,	**Г**
Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt, Wiesbaden	**Г**
Laboratoire Interrégional de la D.G.C.C.R.F de Bordeaux, Talence/France	**Ф**
Unidad de Nutricion y Bromotologia, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca,	**И**
University of Glasgow, Div. of Biochem. and Molek. Biology	**ВБ**
Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau, Klosterneuburg	**А**

17 Лабораторий Г (13); А (1); Ф (1); И (1); ВБ (1)

Метод OIV-MA-AS315-12 Метод II типа

Определение растительных белков в винах и сусле

(Резолюция Oeno 24/2004)

Разработанная ниже методика позволяет определить количество белков, возможно оставшихся в напитках, обработанных белками растительного происхождения, после сцеживания.

1 СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Белки вина и сусла осаждают трихлоруксусной кислотой, затем разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (DSS). Добавление кумасси синего окрашивает белки. Интенсивность окраски позволяет определить содержание белка по калибровочной кривой, построенной заранее с растворами с известной концентрацией белка. Антигенную способность сусла и обработанных вин определяют с помощью иммуноблоттинга.

2 ПРОТОКОЛ

2.1 Концентрирование белков путем осаждения трихлоруксусной кислотой (TCA)

2.1.1 Реактивы

2.1.1.1 Чистая трихлоруксусная кислота (TCA)

2.1.1.2 TCA 0,1%, приготовленная с использованием 2.1.1.1: 0,1 г в 100 мл воды.

2.1.1.3 100%-ная TCA, приготовленная с использованием 2.1.1.1: 100 г в 100 мл воды.

2.1.1.4 Гидроксид натрия 0,5 M

2.1.1.5 Буферный раствор Tris/HCl 0.25 M pH=6.8

30.27 г Tris-(гидроксиметил)аминометана (Tris) растворяют в 300 мл дистиллированной воды. pH доводят до 6.8 помощью концентрированной соляной кислоты для анализа. Объем доводят до 1 л дистиллированной водой. Буферный раствор хранят при 4°C.

2.1.1.6 Чистый глицерин

2.1.1.7 Чистый додецилсульфат натрия (DSS)

2.1.1.8 Чистый 2-меркаптоэтанол

2.1.1.9 Буферный раствор для образцов: состоит из буферного раствора Tris/HCl 0.25 M, pH=6.8 (2.1.1.5); 7,5% чистого глицерина (2.1.1.6); 2% додецилсульфата натрия (DSS) (2.1.1.7) и 5% чистого 2-меркаптоэтанола (2.1.1.8). Процентное содержание различных реагентов соответствует конечной концентрации в буферном растворе.

.1.2 Проведение исследования

В центрифужные пробирки вместимостью 50 мл последовательно помещают 3 мл 100%-ной трихлоруксусной кислоты (2.1.1.3) и 24 мл вина или сусла (обработанного или необработанного). Конечная концентрация в ТСА, полученная таким образом, составляет 11%.

Через 30 минут при 4°C образцы центрифугируют при 10000 об/мин в течение 30 минут при 4°C. Осадки промывают в водном растворе ТСА 0,1% (2.1.1.2), повторно центрифугируют и снова вводят в виде суспензии в 0,24 мл смеси (1:1, об./об.) 0,5 M гидроксида натрия (2.1.1.4). и буферный раствор (2.1.1.9). Образцы нагревают при 100°C на водяной бане в течение 10 минут.

2.2 Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии DSS

2.2.1 Реактивы

2.2.1.1 Буферный раствор Tris/HCl 1.5 M pH=8.8

181.6 г tris-(гидроксиметил)аминометана растворяют в 300 мл дистиллированной воды. pH доводят до 8.8 с помощью концентрированной соляной кислоты для анализа. Объем доводят до 1 л дистиллированной водой. Буфер хранят при 4°C.

2.2.1.2 Смесь акриламида (30 %) - бис-акриламида (0.8 %) ± глицерин (75%)

Медленно добавляют 300 г акриламида и 8 г бис-акриламида к 600 мл 75%-ного раствора глицерина. После растворения доводят объем до 1 л 75%-ным глицерином. Смесь хранят в темноте при комнатной температуре.

2.2.1.3 DSS 10%

10 г DSS растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Хранят при комнатной температуре.

2.2.1.4 N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) ≥99% для электрофореза

2.2.1.5 Персульфат аммония 10%

1 г персульфата аммония растворяют в 10 мл дистиллированной воды. Хранить при 4°C

2.2.1.6 Раствор бромфенолового синего

10 мг бромфенолового синего для электрофореза растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

2.2.1.7 Раствор для разделительного геля (15% акриламида)

Его готовят непосредственно перед употреблением:

- 1.5 мл Tris/HCl 1,5 M, pH=8.8 (2.2.1.1),
- 1.5 мл дистиллированной воды,
- 3 мл смеси глицерина и акриламида (2.2.1.2),
- 50 мкл DSS 10% (2.2.1.3),
- 10 мкл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) для электрофореза
- 20 мкл персульфата аммония (2.2.1.5).
- 1 капля бромфенолового синего (2.2.1.6)

2.2.1.8 Буферный раствор Tris/HCl 0,5 M pH=6.8

60.4 г tris-(гидроксиметил)аминометана растворяют в 400 мл дистиллированной воды. pH доводят до 6.8 с помощью концентрированной соляной кислоты для анализа. Объем доводят до 1 л дистиллированной водой. Буферный раствор хранят при 4°C.

2.2.1.9 Смесь акриламида (30 %) - бис-акриламида (0,8 %) -вода

Медленно добавляют 300 г акриламида и 8 г бис-акриламида в 300 мл воды. После растворения доводят объем до 1 л дистиллированной водой. Смесь хранят в темноте при комнатной температуре.

2.2.1.10 Концентрационный гель с содержанием акриламида 3.5 %.

Его готовят непосредственно перед употреблением:

- 0.5 мл Tris/HCl 0.5 M pH=6.8 (2.2.1.8),

- 1.27 мл дистиллированной воды,
- 0.23 мл водно-акриламидной смеси (2.2.1.9),
- 20 мкл DSS 10% (2.2.1.3),
- 10 мкл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) для электрофореза sis (2.2.1.4),
- 25 мкл персульфата аммония (2.2.1.5),
- 1 капля бромфенолового синего (2.2.1.6).

2.2.1.11 Миграционный буферный раствор

30.27 г tris-(гидроксиметил)аминометана, 144 г глицина и 10 г ДСС растворяют в 600 мл дистиллированной воды. pH должен быть 8.8. При необходимости его доводят концентрированной соляной кислотой для анализа. Объем доводят до 1 л дистиллированной водой. Буфер

хранят при 4°C. Перед употреблением раствор разбавляют до 1/10 дистиллированной водой.

2.2.1.12 Раствор для окрашивания

Последовательно смешиваются:

- 16 мл сверхчистого кумасси бриллиантового синего G-250 5% (5 г на 100 мл дистиллированной воды),
- 784 мл из 1 л раствора, в котором для анализа растворено 100 г сульфата аммония и 13,8 мл ортофосфорной кислоты концентрацией 85%,
- 200 мл абсолютного этанола

2.2.1.13 Обесцвечивающий раствор

Последовательно смешиваются:

- 100 мл уксусной кислоты ледяной 100% для анализа,
- 200 мл абсолютного этанола для анализа.
- 700 мл дистиллированной воды.

2.2.2 Проведение исследования

Раствор разделительного геля (2.2.1.7) заливают между двумя стеклянными пластинами размером 7x10 см. Верхнюю поверхность геля выравнивают добавлением 2 капель дистиллированной воды.

После полимеризации разделительного геля и удаления воды 1 мл концентрирующего геля (2.2.1.10) наносят на разделительный гель с помощью 1 мл пипетки. Затем устанавливается гребенка, отпечатки которой будут создавать специальные углубления, в которых будет скапливаться жидкость.

Образцы, необходимые для диапазона калибровки, готовят в смеси (1:1), об./об., 0,5% М гидроксида натрия (2.1.1.4) и буферного раствора (2.1.1.9) для того, чтобы диапазон калибровки был между 5 мкг/мл и 50 мкг/мл. В емкости вносят от 20 до 30 мкл вина и калибровочного раствора.

После миграции (при постоянном напряжении 90 В) при комнатной температуре в течение примерно 3-4 часов гели вынимают из формы. Их немедленно погружают в 50 мл 20% водного раствора TCA на 30 минут, затем в 50 мл красящего раствора (2.2.1.12).

Белки появляются в виде полос синего цвета. Затем гель обесцвечивают 50 мл обесцвечивающего раствора (2.2.1.13). Когда дно геля станет прозрачным, его помещают в дистиллированную воду для хранения.

3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Интенсивность каждого пятна оценивается с помощью сканера для геля с программным обеспечением для анализа изображений. Количество белка на геле определяют путем расчета средней плотности пикселей полосы и интегрирования ширины полосы. Содержание белка в каждом образце получают с помощью калибровочной кривой. Точки этой кривой получены путем отслеживания известных значений концентрации растительных белков, нанесенных на гель, в зависимости от соответствующей области интеграции.

Предел обнаружения и количественного определения составляет около 0.030 частей на миллион для гороха и 0.36 частей на миллион для глютена в среде, концентрированной в 100 раз. Коэффициент вариации всегда ниже 5%.

4 ПОИСК ИММУНОБЛОТТИНГОМ АНТИГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ОБРАБОТАННЫХ ВИН И СУСЕЛ

Затем оценивают антигенную способность белков, которые могут остаться в напитках, обработанных после переливания.

4.1 СУЩНОСТЬ МЕТОДА

После электрофореза гели подвергают иммуноблоттингу. Белки переносятся на мембрану, где они адсорбируются. Комплекс антиген-антитело образуется путем добавления растительного антитела к белку (например, антитела к глиадину, если растительным белком является глютен). Способ раскрывается добавлением антител, направленных против растительных антибелковых антител, связанных с фосфатазой. В присутствии хромогенного субстрата фермента возникает окраска, интенсивность которой будет пропорциональна количеству иммунокомплексов. Эта иммунореактивность будет количественно определена с использованием калибровочной кривой, построенной с использованием растворов растительных белков известной концентрации.

4.2 ПРОТОКОЛ

4.2.1 : Реактивы

4.2.1.1 Трансферный буферный раствор

3,03 г Tris, 14,4 г глицина (P), 200 мл метанола (P) смешивают и доводят до 1 л дистиллированной водой.

4.2.1.2 Желатин 1%

В 800 мл дистиллированной воды растворяют 8,77 г хлорида натрия (R), 18,6 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) для анализа, 6,06 г

Tris и 0,5 мл Тритона X. pH доводят до 7,5 с помощью концентрированной соляной кислоты для анализа. Добавляют 10 г желатина и доводят объем до 1 л.

4.2.1.3 Желатин 0.25%

В 800 мл дистиллированной воды растворяют 8.77 г хлорида натрия (R), 18,6 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) для анализа, 6,06 г Tris и 0,5 мл Тритона X. pH доводят до 7,5 с помощью концентрированной соляной кислоты для анализа. Добавляют 2,5 г желатина и доводят объем до 1 л.

4.2.1.4 Раствор поликлональных антител (продается или описан в приложении)

- 10 мкл поликлональных растительных антибелковых антител
- к.с.ф. 10 мл с желатином 0,25% (4.2.1.3).

4.2.1.5 TBS буфер

В 1 л дистиллированной воды растворяют 29.22 г натрия хлорида для анализа и 2.42 г tris.

4.2.1.6 Буфер щелочной фосфатазы

5.84 г хлорида натрия (R), 1,02 г хлорида магния (R) и 12,11 г Tris растворяют в 800 мл дистиллированной воды. pH доводят до 9.5 с помощью концентрированной соляной кислоты и доводят объем до 1 л.

4.2.1.7 Проявитель

15 г бромхлориндолфосфата (BICP) и 30 г нитросинего тетразолия (NBT) растворяют в 100 мл буфера щелочной фосфатазы (4.2.1.6)

4.2.2 Проведение исследования

После электрофореза белки переносят из геля на мембрану из поливинилидендифторида путем электрофоретического элюирования: 16 часов при 4°C при 30 В в буфере для переноса (4.2.1.1). Мембраны насыщают желатином с концентрацией 1% (4.2.1.2) и промывают 3 раза желатином с концентрацией 0.25% (4.2.1.3). Желатин застывает на свободных участках и ингибирует неспецифическую адсорбцию иммунологических реагентов. Затем мембрану погружают в 10 мл раствора поликлональных антител к растительным белкам (4.2.1.4). Для глютена приобретаются антиглиадиновые антитела. Другие типы антител получают в соответствии со способом, описанным в приложении. Комплекс IgG-антиген выявляют добавлением 10 мкл анти-IgG кроличьих антител, меченных щелочной фосфатазой. Мембраны дважды промывают 0.25% желатином (4.2.1.3) и один раз буфером TBS (4.2.1.5). После инкубации в проявителе (4.2.1.7) в месте прикрепления фермента образуется темно-фиолетовый осадок.

4.3 КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для расчета величины остаточной иммунореактивности товарного вина вычерчивают калибровочную кривую: известные концентрации растительных белков, нанесенных на гель (и перенесенных на мембрану) в зависимости от площадей, полученных путем интегрирования интенсивности пятен соответствующий образованию иммунного комплекса. Анализ проводят на том же оборудовании, что и для анализа гель-электрофореза.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Производство поликлональных гороховых антител

Для получения гороховых поликлональных антител, необходимых для определения антигенной способности белков гороха в обработанном вине и сусле, использовались животные.

1 Сущность метода

Сыворотки, содержащие поликлональные антитела, получают от новозеландских кроликов после внутрикожной инъекции антигена.

2 Протокол

2.1 Реактивы

2.1.1 Фосфатный буфер PBS pH=7.4: 8 г NaCl, 200 мг KCl, 1.73 г $Na_2HPO_4H_2O$ и 200 мг KH2PO4 растворяют в 300 мл дистиллированной воды. pH доводят до 7,4 с помощью 1 M гидрата натрия. Объем доводят до 1 л дистиллированной водой.

2.1.2 Антигены:

10 мг белка гороха растворяют в 5 мл фосфатного буфера PBS (2.1.1). Затем раствор фильтруют в стерильных условиях через 0.2 мкм и хранят при температуре -20°C до дня иммунизации.

2.2 Проведение исследования

1 мл раствора 2.1.2. смешивают с 1 мл полного адъюванта Фрейнда. Новозеландскому кролику весом около 3 кг внутрикожно вводят 1 мл этой смеси. Эту инъекцию повторяют на 15-й, 30-й и 45-й день.

Через 60 дней после первой инъекции из ушной вены брали 100 мкл крови, которую затем проверяли на способность реагировать на антигены. Для этой оценки использовали иммуноблоттинг, как описано в главе 4.2 метода анализа с использованием геля с гороховым белком, который мигрировал на геле.

После проверки образования комплекса антиген-антитело было взято 15 мл крови из ушной вены. Кровь выдерживают при температуре 37°C в течение 30 минут. Сыворотку, содержащую поликлональные антигороховые антитела, извлекают после центрифугирования крови при 3000 об/мин в течение 5 минут.

Метод OIV-MA-AS315-13 Метод IV типа

Определение наличия и содержания полихлорфенолов и полихлоранизолов в винах, корковых пробках, древесине и бентонитах, используемых в качестве атмосферных ловушек

(Резолюция 8/2006)

ИСКЛЮЧЕН
(Заменено на OIV-MA-AS315-16)

Метод OIV-MA-AS315-14 Метод IV типа

Измерение лизоцима в вине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(Резолюция Oeno 8/2007)

1. **Введение**

Предпочтительно иметь метод анализа лизоцима, не основанный на активности ферментов.

2. **Область применения**

Метод позволяет количественно определить лизоцим (мг белка на л), присутствующий в красных и белых винах, независимо от активности фермента (которая может быть ингибирована частичной денатурацией или явлениями комплексообразования или соосаждения), обнаруженной в испытуемом растворе.

3. **Определение метода**

HPLC обеспечивает аналитический подход, основанный на стерических, полярных или адсорбционных взаимодействиях между стационарной фазой и аналитом, и поэтому не связан с фактической ферментативной активностью, проявляемой белком.

4. **Сущность метода**

Анализ проводят с помощью HPLC со спектрофотометрическим детектором, объединенным со спектрофлуориметрическим детектором. Неизвестное количество в образце вина рассчитывается по площадям хроматографических пиков с использованием метода внешней калибровки.

5. **Реактивы**

5.1. Растворители и рабочие растворы

Анализ HPLC на ацетонитриле (CH_3CN)
Чистая трифторуксусная кислота (TFA)
деионизированная вода для анализа HPLC
Стандартный раствор: винная кислота 1 г/л, этиловый спирт 10% об./об., pH доведен до 3.2 с помощью нейтрального виннокислого калия.

5.2. Элюенты

A: CH_3CN 1%, TFA 0.2 %, H_2O= 98.8%
B: CH_3CN 70%, TFA 0.2 %, H_2O= 29.8%

5.3. Референсный раствор

Лизоцим

Количества от 1 до 250 мг/л стандартного лизоцима растворяют в стандартном растворе при непрерывном перемешивании в течение не менее 12 часов.

6. Оборудование

6.1. Аппарат для HPLC, оснащенный насосной системой, подходящей для градиентного элюирования.

6.2. Отсек термостатируемой колонки (печь)

6.3. Спектрофотометр в сочетании со спектрофлуориметром

6.4. 20 мкл петлевой дозатор

6.5. Колонка: полимер в обращенной фазе с фенильными функциональными группами (диаметр пор = 1000 Å, предел эксклюзии = 1000000 Da). Например, Toso Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP, 7.5 см x 4.6 мм ID.

6.6. Предколонка из того же материала, что и колонка: например, Toso Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel, 1.5 см 3.2мм ID

7. Подготовка образца

Образцы вина подкисляют HCl (10M), разбавленной 1/10, и фильтруют с использованием полиамидного фильтра с диаметром пор 0.22 мкм через 5 минут после добавления. Хроматографический анализ проводят сразу после фильтрования.

8. Условия эксплуатации

8.1. Скорость потока элюента: 1 мл/мин.

8.2. Температура колонки: 30°C

8.3. Спектрофотометрическое детектирование: 280 nm

8.4. Спектрофлуориметрическое детектирование:

λ ex = 276 nm;
λ em = 345 nm;
Gain = 10 усиление

8.5. Последовательность градиентного элюирования

Время	A	B	Градиент
0	1	0	
			изократичес
3	1	0	
			линейный
10	65	35	
			изократический

15	65	35	
			линейный
27	40.5	59.5	
			линейный
29	0	100	
			изократический
34	0	100	
			линейный
36	100	0	
			изократический
40	100	0	

8.6 Среднее время удерживания лизоцима: 25.50 минут.

9. Расчеты

Эталонные растворы, содержащие следующие концентрации лизоцима: 1; 5; 10; 50; 100; 200; 250 мг/л анализируют в трех повторностях. Для каждой хроматограммы площади пиков, соответствующих лизоциму, нанесены согласно соответствующим концентрациям, чтобы получить линии линейной регрессии, выраженные формулой $Y=ax+b$. Коэффициент корреляции r^2 должен быть > 0.999.

10. Характеристики метода

Было проведено валидационное исследование с целью оценки пригодности метода для рассматриваемой цели с учетом линейности, пределов обнаружения и количественного определения, а также точности метода. Последний параметр определялся измерением уровней прецизионности и правильности метода.

10.1 Линейность метода

На основании результатов, полученных в результате линейного регрессионного анализа, метод оказался линейным в пределах диапазонов, указанных в таблице ниже:

	Диапазон линейности (мг/л)	Линейный градиент	Коэффициент корреляции 2(r)	Предел обнаружения (мг/л)	Предел количественного определения (мг/л)	Повторяемость (n=5) RSD%			Воспроизводимость (n=5) RSD%
						Std1	V.R.2	V.B.3	Std1
УФ	5-250	3 786	0,9993	1,86	6,20	4,67	5,54	0,62	1,93
FLD	1-250	52 037	0,9990	0,18	0,59	2,61	2,37	0,68	2,30

Table 1: Данные, относящиеся к характеристикам метода: [1] стандартный раствор ; [2] красное вино ; [3] белое вино

10.2 Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения (LD) и предел количественного определения (LQ) рассчитывали как сигнал, эквивалентный соответственно 3-кратному и 10-кратному фоновому хроматографическому шуму в рабочих условиях на реальном тестовом растворе (таблица 1).

10.3 Точность метода

Учитывались такие параметры, как повторяемость и воспроизводимость. В таблице 1 приведены значения этих параметров (выраженные в % ст. откл. повторных измерений в разных концентрациях), найденные для стандартного раствора, красного вина и белого вина.

10.4 Достоверность метода

Процент восстановления рассчитывали для стандартных растворов, содержащих 5 и 50 мг/л лизоцима, с добавлением известных количеств лизоцима, как показано в таблице ниже.

	Начальный номинал [C] (мг/л)	Добавленное количество (мг/л)	Теоретическ. [C] (мг/л)	[C] Обнаружен.	Стд. Откл.	% Восстановления
UV 280 nm	50	13.1	63.1	62.3	3.86	99
FD	50	13.1	63.1	64.5	5.36	102
UV 280 nm	5	14.4	19.4	17.9	1.49	92.1
FD	5	14.4	19.4	19.0	1.61	97.7

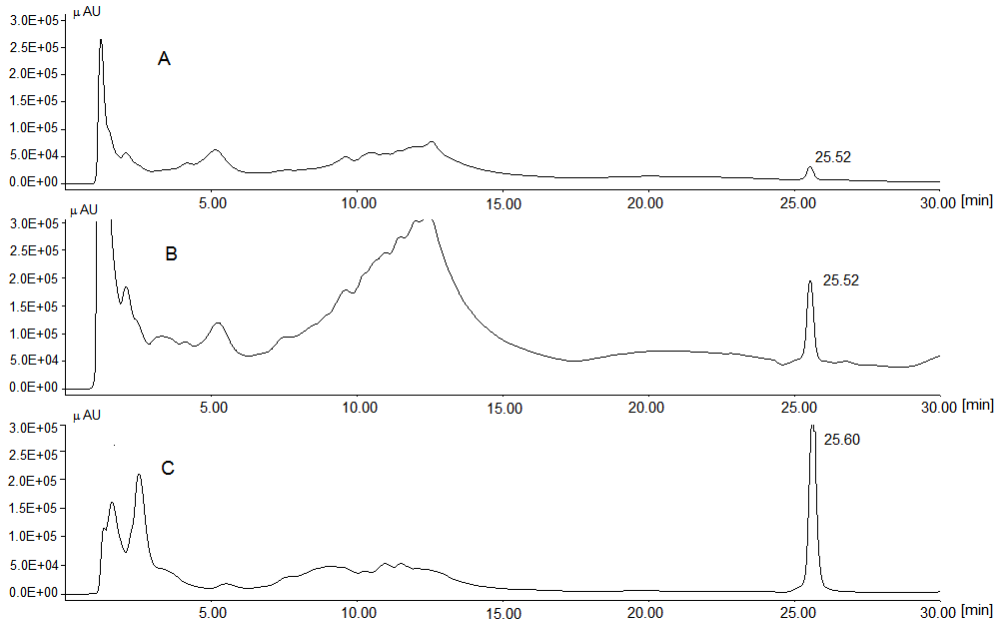


Рис.1 Хроматограмма красного вина, содержащего чистый лизоцим (в вино добавляли стандартный раствор, содержащий 1000 мг/л лизоцима, чтобы получить конечную концентрацию лизоцима 125 мг/л). A: УФ-детектор при 280 нм; B: УФ-детектор при 225 нм; C: FLD-детектор (λ ex 276 нм; λ em 345 нм).

11.Библиография

Claudio Riponi; Nadia Natali; Fabio Chinnici. Quantitation of hen's egg white lysozyme in wines by an improved HPLC-FLD analytical method. Am. J. Enol. Vit., in press.

Метод OIV-MA-AS315-15 Тип II метод

Определение 3-метоксипропан-1,2-диола и циклических диглицеролов (побочные продукты технического глицерина) в вине методом GC-MS

- описание метода и совместного исследования - -

(Резолюция Oeno 11/2007)

1. Введение

Это проверенный на международном уровне метод определения 3-метоксипропан-1,2-диола (3-MPD) и циклических диглицеролов (CycDs), которые считаются примесями технического глицерина, в различных типах вина. Известно, что глицерин, полученный переэтерификацией триглицеридов растений и животных с использованием метанола, содержит значительное количество 3-МПД. Синтез глицерина из нефтехимических продуктов приводит к примесям CycDs. Один из опубликованных методов [1, 2, 3i] был принят, модифицирован и протестирован в совместном исследовании. Здесь мы представляем оптимизированный метод и сообщаем о результатах совместного исследования [2]. Концепция и оценка валидационного исследования производились в соответствии с резолюцией OIV 8/2000 “ Протокол валидации аналитических методов ”.

2. Область применения

Описанный метод подходит для определения 3-МПД и 6-циклических диглицеролов (цис-, транс-2,6-бис(гидроксиметил) 1,4-диоксана; цис-, 7 транс-2,5-бис(гидроксиметил)1,4-диоксан; цис-, транс-2,-гидроксиметил-6-гидрокси-1,4-диоксепан) в белых, красных, сладких и сухих винах. Описанное исследование охватывает диапазон концентраций от 0,1 до 0,8 мг/л для 3-MPD и от 0,5 до 1,5 мг/л для CycDs.

3. Термины

3-MPD	3-MPD 3-метоксипропан-1,2-диол
ANOVA	Дисперсионный анализ

C	Концентрация
CycDs	Циклические диглицеролы
GC-MS	Газовая хроматография ± масс-спектрометрия
H_2	Водород
IS	Внутренний стандарт
m/z	отношение масса/заряд
ML	Уровень калибровки матрицы ML
S0	Стандартное разведение 1000 нг/мкл
S1	Стандартное разведение 100 нг/мкл
S2	Стандартное разведение 10 нг/мкл

4. Сущность метода

Аналиты и внутренний стандарт высаливают добавлением K2CO3 и экстрагируют диэтиловым эфиром. Экстракты анализируют непосредственно с помощью GC-MSна полярной колонки. Затем детектирование проводится в выбранном режиме мониторинга ионов.

5. Реактивы и материалы

5.1. Химические вещества

5.1.1 K_2CO_3 р.А.
5.1.2 Диэтиловый эфир Увасол для спектроскопии
5.1.3 Молекулярное сито (диаметр 2 мм, размер пор 0,5 нм)
5.1.4 Этанол (абсолютный)

5.2. Стандарты

5.2.1 Циклическая смесь диглицеринов (6 компонентов) Solvay Alkali GmbH[1], 89.3 %

цис-, транс-2,6-бис(гидроксиметил) 1,4-диоксан; цис-, транс-2,5-бис(гидроксиметил) 1,4-диоксан; цис-, транс-2,-гидроксиметил-6-гидрокси-1,4-диоксепан

5.2.2 3-Метоксипропан-1,2-диол (3-MPD) 98% (CAS 623-39-2)
5.2.3 Бутан-1,4-диол-1,1,2,2,3,3,4,4--(^2H)$_8$ 98% (CAS 74829-49-5)

5.3. Приготовление стандартных растворов

5.3.1 Стандартные растворы S0

Точно взвешивают 10,0 мг ± 0,05 мг каждого стандартного вещества (для CycDs взвешивают 11,2 мг, что соответствует чистоте 89,3 %) и помещают их в мерные колбы объемом 10 мл (по одной на каждое).

Добавляют ровно 10 мл этанола и тщательно перемешивают. Концентрация этого раствора составляет 1000 нг/мкл.

5.3.2 Рабочие растворы S1

Волюметрическим методом переносят 1000 мкл стандартного раствора S0 (6.3.1) в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят содержимое до нужного объема этанолом, тщательно закрывают колбу и переворачивают для перемешивания. Концентрация этого раствора составляет 100 нг/мкл.

[1] Solvay Alkali GmbH больше не предоставляет стандартную смесь; растворы смеси можно получить в BfR. Федеральный институт по оценке рисков, Thielallee 88-92, D-14195 Berlin. www.bfr.bund.de; poststelle@bfr.bund.de

5.3.3 Рабочие растворы S2

Волюметрическим методом переносят 100 мкл исходного раствора SO (6.3.1) в мерную колбу объемом 10 мл, доводят содержимое до нужного объема этанолом, тщательно закрывают колбу и переворачивают для перемешивания. Концентрация этого раствора составляет 10 нг/мкл.

Обзор необходимых стандартных растворов:
смесь CycDs (6 компонентов)

Раствор	Концентрация	
S0	1000	нг/мкл
S1	100	нг/мкл

3-метоксипропан-1,2-диол (3-MPD)

Раствор	Концентрация	
S0	1000	нг/мкл
S1	100	нг/мкл
S2	10	нг/мкл

1,4 Бутан -1,4-($^{2}H)_{8}$ (внутренний стандарт IS)

Раствор	Концентрация	
S0	1000	нг/мкл
S1	100	нг/мкл

5.4. Подготовка кривой калибровки матрицы

Калибровочные растворы, соответствующие матрице, готовятся в чистом вине. Сначала необходимо проанализировать это вино, чтобы убедиться, что оно не загрязнено 3-MPD или CycDs. Если концентрации аналитов в образце выходят за пределы диапазона калибровочной кривой, необходимо подготовить дополнительные уровни. Чтобы гарантировать, что внутренний стандарт, взаимодействующй с каким-либо компонентом вина, не влияет на достоверность результатов исследования, в него включают холостой раствор.

Таблица 1. Схема пипетирования калибровки матрицы

Уровень матрицы	калибровки			Объем вина	С Вино	С Вино
		Пик мкл		мл	мкг/л	мг/л
Хол. р-р.	IS	-		10	0	0
	3-MPD	-				
	CycDs	-				
ML0	IS	100	S1	10	1000	1.00
	3-MPD	-				
	CycDs	-				
ML1	IS	100	S1	10	1000	1.00
	3-MPD	100	S2		100	0.10
	CycDs	50	S1		500	0.50
ML2	IS	100	S1	10	1000	1.00
	3-MPD	25	S1		250	0.25
	CycDs	100	S1		1000	1.00
ML3	IS	100	S1	10	1000	1.00
	3-MPD	50	S1		500	0.50
	CycDs	20	S0		2000	2.00
ML4	IS	100	S1	10	1000	1.00
	3-MPD	100	S1		1000	1.00
	CycDs	30	S0		3000	3.00
ML5	IS	100	S1	10	1000	1.00
	3-MPD	200	S1		2000	2.00
	CycDs	40	S0		4000	4.00

6. Используемое оборудование

6.1 Аналитические весы. Дискретность показаний ±0,0001 г.

6.2 Лабораторная центрифуга (не менее 4000 об/мин)

6.3 Газовый хроматограф. С масс-спектрометрическим детектором, инжектором с делением и без деления потока,

6.4 Различные прецизионные пипетки и мерные колбы

6.5 Пипетки Пастера

6.6 Флаконы для центрифугирования на 40 мл

6.7 Флаконы для ГХ (1,5 ± 2,0 мл)

6.8 Термостат

6.9 Встряхиватель

7. Отбор образцов

Образцы вина для анализа должны быть взяты в достаточном объеме. Объем, необходимый для одного испытуемого образца, составляет 10 мл. Вино, используемое для приготовления калибровки матрицы (5.4), не должно содержать аналита.

8. Проведение исследования

8.1. Экстракция

Добавляют100 мкл раствора внутреннего стандарта S1 (6.3.2) к 10 мл вина в подходящую пробирку для центрифугирования объемом 40 мл. (Это соответствует концентрации 1 мг/л бутан-1,4-($^2H)_8$). Осторожно добавляют 10 г K_2CO_3 и перемешивают. Необходимо быть осторожным, так как из-за выделения CO2 появляется большое количество тепла. После охлаждения раствора примерно до 20°C на водяной бане добавляют 1 мл диэтилового эфира.

Гомогенизируют смесь в течение 5 минут с помощью вертикального встряхивателя. Центрифугируют флаконы при 4000 об/мин в течение 5 мин. Для лучшего удаления органической фазы экстракт можно частично перенести во флакон меньшего диаметра. С помощью пипетки Пастера переносят верхнюю органическую фазу, состоящую из диэтилового эфира и этанола, во флакон для ГХ. Добавляют примерно 120 мг молекулярного сита во флакон. Закрывают флакон, оставляют не менее чем на 2 ч и время от времени горвГошо встряхивают. Прозрачный супернатант переносят во второй флакон для ГХ для анализа ГХ-МС.

8.2. GC-MS анализ

Конкретные параметры анализа GC-MS приведены ниже. Можно использовать альтернативные системы, если они обеспечивают аналогичные хроматографические характеристики и достаточную чувствительность. Хроматографическая система должна быть способна отделять внутренний стандарт от фенилэтанола, который может создавать помехи.

Типичные условия для проведения ГХ

Газовый хроматограф: HP 5890 или аналогичный

Колонка DB-Wax (J&W) 60 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,25 мкм, 2-метровая капиллярная защитная оболочка тех же размеров или аналогичная

Газ-носитель: H2
Расход: Давление 60 кПа в головке колонны
Температурная программа :
90°C, 2 мин, линейное изменение скорости 10°C/мин. до 165°C, выдержка 6 мин, повышение температуры со скоростью 4°C/мин до 250°C, выдержка 5 мин.
Температура впрыска: 250°C; Вводимый объем; 2 мкл, 90 с без деления

Конкретные условия масс-спектрометрии
Масс-спектрометр: Finnigan SSQ 710 или аналогичный
Линия передачи: 280°C
Источник: 150°C
Масс-спектрометрическое детектирование:
Окно1.: 0-25 мин.:
14.3 мин. 3-MPD: *м/з* 75, *м/з* 61
16.7 мин IS: *м/з* 78, *м/з* 61
Время сбора данных для каждой массы составляет 250 мкс (время выдержки). Следят за m/z 91 отделением пика внутреннего стандарта (IS) от фенилэтанола, который также производит фрагмент м/з 78.
окно 2. 25-40 мин.:
32-34.5 мин. CycDs: *м/з* 57, *м/з* 117
Время сбора данных для каждой массы составляет 250 мкс (время выдержки).

Было замечено, что анализ может ухудшить состояние хроматографической колонки. В частности, предполагается, что введение высококипящей смеси CycDs вызывает необратимые повреждения. Следует избегать инъекций стандартных референтных растворов; анализ должен быть ограничен высоленными растворами с низкой концентрацией аналита. Кроме того, рекомендуется использовать предколонку длиной 1-2 мм для защиты аналитической колонки. Тем не менее, аналитическую колонку следует рассматривать как расходный материал, и ее необходимо регулярно заменять.

9. Оценка результатов

9.1. Идентификация

Записывают относительное время удерживания каждого аналита к времени удерживания IS. Рассчитывают среднее относительное время

удерживания аналитов в калибровочных стандартах. Относительное время удерживания аналита должно быть таким же, как у стандарта, с

погрешностью ± 0,5 %. В качестве критерия подтверждения можно рассчитать соотношение ионов для каждого аналита из выбранного ионного мониторинга. Это соотношение составляет 117/57 для CycDs, 75/61 для 3-MPD и 78/61 для IS. Отношение должно быть в пределах r 20 % от того, которое обнаружено в пробе с добавкой стандартного раствора. Также может быть использовано подтверждение идентичности веществ полным сканированием с помощью ионов.

9.2. Количественная оценка

Количественное определение проводят по калибровочной кривой матрицы, подготовленной в соответствии с соответствующим разделом. Отношения аналит/площадь IS для указанных массовых соотношений коррелируют линейной регрессией с концентрацией аналита. Количественное определение CycDs достигается путем суммирования площадей всех шести пиков и расчета общего содержания вещества, чтобы учесть другие распределения шести характерных CycDs, отличные от стандартного. Для количественного определения используются следующие значения м/з:

3-MPD:	м/з 75
IS:	м/з 78
CycDs:	м/з 117

9.3. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты должны быть выражены в мг/л для 3-MPD и CycDs с двумя десятичными знаками (например, 0,85 мг/л).

9.4 Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения (LD) и предел количественного определения (LQ) зависят от индивидуальных условий измерения химического анализа и должны определяться пользователем метода.

Предел обнаружения (LD) и предел количественного определения (LQ) были оценены с использованием приборов и условий, упомянутых в качестве примера выше (с. 8), в соответствии с инструкциями в резолюции OENO 7-2000 (E-AS1-10-LIMDET). “оценка пределов обнаружения и количественного определения метода анализа”

Вместе с “Логической схемой для принятия решений” в N3 графовый подход должен применяться г в соответствии с параграфом 4.2.2. Для этой цели часть хроматограммы берется в расширенном виде, охватывая диапазон десятикратной ширины средней высоты (w½) пика, соответствующего антоцианину. Кроме того, рисуются две параллельные линии, которые охватывают максимальную амплитуду сигнального окна.
Расстояние между этими двумя линиями дает hmax, выраженное в единицах численности, умножается на 3 для LD, на 10 для LQ и, наконец, преобразуется в единицы концентрации путем применения коэффициента индивидуальной реакции.

3-MPD:
LD: 0,02 мг/л
LQ: 0,06 мг/л
CycDs (сумм):
LD: 0,08 мг/л
LQ: 0,25 мг/л

(Примечание: Поскольку CD представляет собой смесь шести отдельных соединений с одинаковым коэффициентом отклика - из-за их химического равенства - и с константой h_{max} в соответствующей части хроматограммы, LD и LQ для каждого отдельного соединения составляют одну шестую цифр, представленных выше)

10. Характеристики точности метода (межлабораторная валидация)

В совместном исследовании приняли участие 11 лабораторий. Участвующие лаборатории имеют подтвержденный опыт анализа побочных продуктов. Все они участвовали в предварительном исследовании. Было обнаружено, что повторяемость (r) и воспроизводимость (R) и соответствующие стандартные отклонения (Sr и SR) статистически значимо коррелируют с концентрацией аналитов (ПРИЛОЖЕНИЕ: рисунки 1 и 2), r с вероятностью более 95% и R с вероятностью более 99% для каждого из аналитов с использованием модели линейной регрессии.
Фактические параметры производительности можно рассчитать по формуле:

3-MPD

Sr = 0,060 x SR = 0,257 x	x = концентрация 3-MPD [мг/л]
r = 0,169 x R = 0,720 x	x = концентрация 3-MPD [мг/л]

CycDs

Sr = 0,082 x SR = 0,092 x + 0,070	x = концентрация CycDs [мг/л]
r = 0,230 x R = 0,257 x + 0,197	x = концентрация CycDs [мг/л]

ПРИЛОЖЕНИЕ (Межлабораторное исследование)

Участники

В совместном исследовании приняли участие 11 международных лабораторий (5). Участвующие лаборатории имеют подтвержденный опыт анализа побочных продуктов. Все они участвовали в предварительном исследовании:

CSL, York, UK
Unione Italiana Vini, Верона, Италия
BfR, Берлин, Германия
BLGL, Вюрцбург, Германия
Istituto Sperimentale per l'enologia, Асти, Италия
LUA, Шпайер, Германия
Labor Dr. Haase-Aschoff, Бад-Кройцнах, Германия
CLUA, Манстер, Германия
Kantonales Laboratorium, Фюллинсдорф, Швейцария
LUA, Кобленц, Германия
ISMAA, Сан-Микеле-аль-Адидже, Италия

Образцы

В ноябре 2002 года участвующим лабораториям было отправлено 11 образцов вина, состоящих из пяти случайных наборов для слепого двойного анализа и еще одного отдельного тестового материала. В качестве тестовых материалов использовались сухие белые вина, сухие красные вина и сладкое красное вино. Образцы предварительно подвергали тестированию на однородность (ii).

Анализ данных

Статистический анализ проводился в соответствии с “Протоколом раработки, проведения и интерпретации исследований эффективности метода”(iii) с использованием случайной дублирующей модели.

1. Определение выбросов оценивали методами одностороннего теста Кохрана, Граббса и двустороннего теста Граббса.
2. Был проведен статистический анализ для получения данных о повторяемости и воспроизводимости.
3. Были рассчитаны значения коэффициента Горвитца

Таблица 2. Результаты 3-MPD

	Образец A Белое вино	**Образец B Красное вино[a]**	**Образец C Белое вино**	**Образец D Сл. красное вино**	**Образец E Белое вино**	**G**
Ср. зн. мг/л	**0.30**	**0.145**	**0.25**	**0.48**	**0.73**	
В пике мг/л	0.30	0.12	-	-	0.80	
% восстановления	100	121	-	-	91	
n	10	10 [a]	10	10	10	
nc	1	1 [a]	1	1	1	
outliers	2	0	0	1	1	
n1	7	9 [a]	9	8	8	
r	0.03	-	0.05	0.08	0.13	
sr	0.01	-	0.02	0.03	0.05	
RSDr %	3.20	-	7.20	5.80	6.57	
Hor	**0.30**	**-**	**0.60**	**0.50**	**0.59**	
R	0.13	0.13	0.15	0.31	0.59	
sR	0.05	0.05	0.05	0.11	0.21	
RSDr %	15.50	32.67	21.20	22.70	28.91	
HoR	**0.80**	**1.53**	**1.10**	**1.30**	**1.72**	

[a] Единый тестовый образец; n, nc и n1 — одиночные результаты

mean среднее арифметическое данных, используемых в статистическом анализе

n общее количество представленных наборов данных

nc количество результатов (лабораторий), исключенных из-за несоответствия результатов

outliers количество результатов (лабораторий), исключенных из-за того, что их результаты были признаны несоответствующими по тестам Кохрана или Граббса

n1 количество результатов (лабораторий), оставшихся в стат. анализе

S_r стандартное отклонение повторяемости

RSD_r относительное стандартное отклонение повторяемости (S_rx100/ср.ар.)

r предел повторяемости (2.8 x S_r)

Ho_r значение Горвитца для повторяемости равно наблюдаемому RSDr, деленному на Значение RSDr, рассчитанное по уравнению Горвитца,
где r = 0,66

R воспроизводимость (между лабораторными вариантами) (2,8 x SR)

S_R стандартное отклонение воспроизводимости

RSD_R относительное стандартное отклонение воспроизводимости (S_Rx100/ср.ар.)

Ho_R значение Горвитца для воспроизводимости - это наблюдаемое значение RSDR, деленное на значение RSDR, рассчитанное по уравнению Горвитца

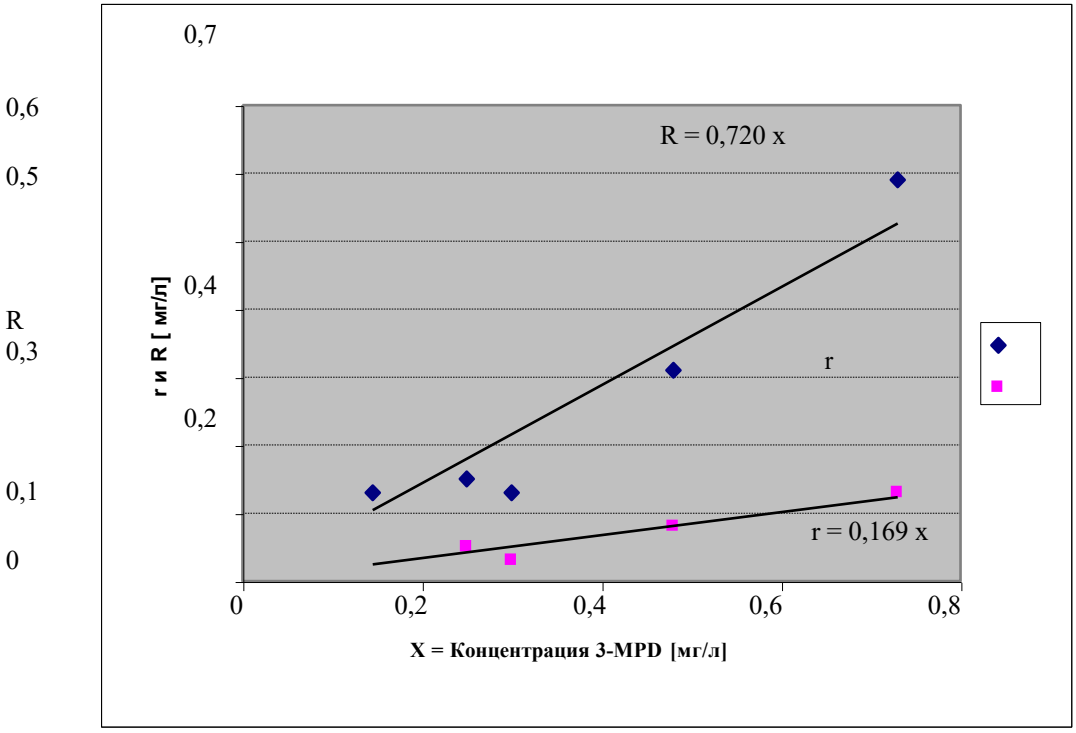


Рисунок 1. Корреляция между концентрацией 3-MPD и r,R

Таблица 3. Результаты для циклических диглицеролов

	Образец A	**Образец B**	**Образец C**	**Образец D**	**Образец E**
	Белое вино	**Красное вино**[a]	**Красное вино**	**Сл. красное вино**	**Белое вино**
Ср. зн. мг/л	**1.55**	**0.593**	**0.80**	**0.96**	**0.56**
В пике мг/л	1.50	0.53			0.50
% восстановления	103	113			112
n	11	11[a]	11	11	11
nc	0	0	0	0	0
outliers	2	0	1	2	1
n1	9	11[a]	10	9	10
r	0.37	-	0.19	0.18	0.15
sr	0.13	-	0.07	0.07	0.05
RSDr %	8.50	-	8.60	6.70	9.30
Hor	**0.90**	**-**	**0.80**	**0.60**	**0.80**
R	0.61	0.379	0.39	0.41	0.34
sR	0.22	0.135	0.13	0.15	0.12
RSDR %	14.00	22.827	17.30	15.20	21.50
HoR	**0.90**	**1.319**	**1.00**	**0.90**	**1.20**

[a] Единый тестовый образец; n, nc и n1 — одиночные результаты

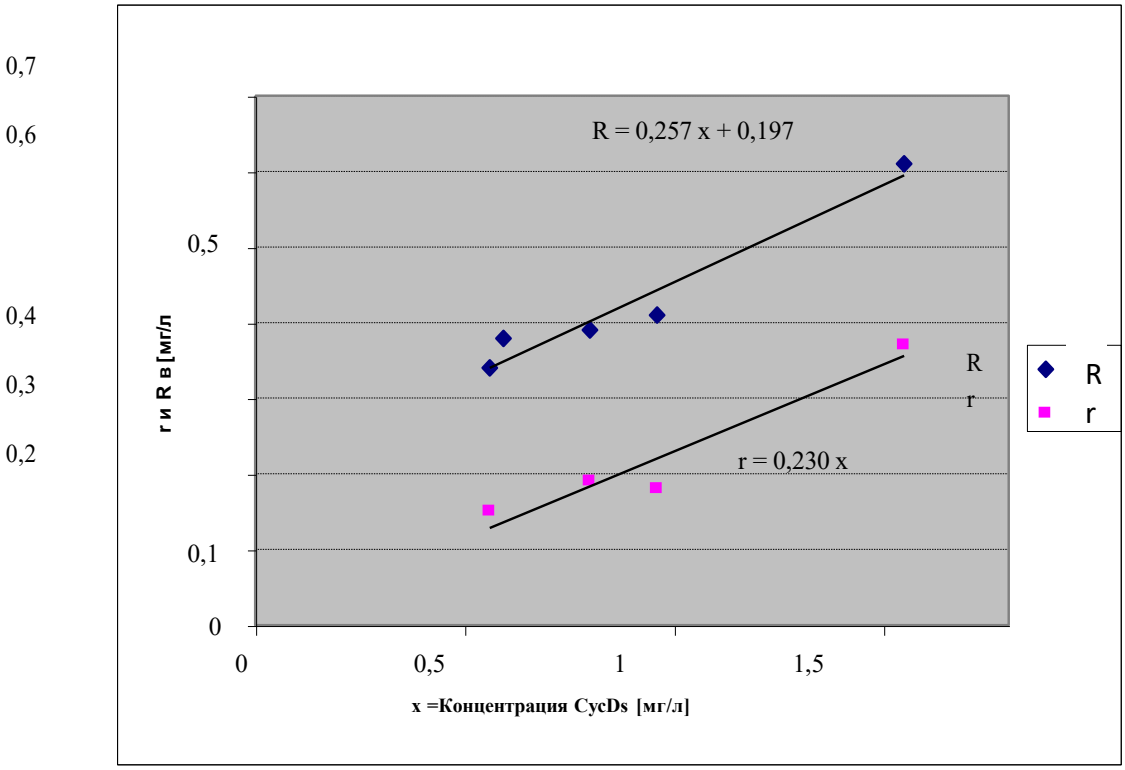


Рисунок 2. Корреляция между концентрацией CycDs и r,R.

(1) Bononi, M., Favale, C., Lubian, E., Tateo F. (2001)
A new method for the identification of cyclic diglycerols in wine
J. Int. Sci. Vigne Vin. 35, 225-229

(2) Thompson, M. and Wood, R. (1993)
International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of
(Chemical) Analytical Laboratories - J AOAC Int 76, 926-940

(3) Horwitz ,W. (1995)
Protocol for the design, conduct and interpretation of method- performance studies
Pure and Applied Chemistry 67**,** 331-343

Метод OIV-MA-AS315-16 Метод IV типа

Определение выделяющегося 2,4,6-трихлоранизола в вине корковыми пробками

(Резолюция OIV-Oeno 296/2009)

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод определения высвобождаемого корковыми пробками 2,4,6-трихлоранизола (TCA) измеряет количество TCA, выделившееся из корковой пробки, мацерированной в водно-спиртовом растворе. Целью этого метода является оценка риска высвобождения TCA в партии анализируемых пробок и обеспечение метода контроля качества пробок.

2 СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод направлен на моделирование явлений миграции 2,4,6-трихлоранизола, которые могут возникать между пробкой и вином в бутылках. Корковые пробки вымачивают в вине или водно-спиртовом растворе до достижения баланса. TCA паровой фазы отбирают из соответствующей части мацерата методом твердофазной микроэкстракции (SPME), затем анализируют методом газовой хроматографии с детектированием масс-спектрометром (или электронозахватным детектором).

3 РЕАКТИВЫ И ПРОДУКТЫ

3.1 Белое вино с крепостью алкоголя от 10 до 12 % об. (Можно заменить водно-спиртовым раствором с концентрацией спирта 12 % об.). Вино и/или водно-спиртовой раствор не должны содержать TCA.

3.2 Хлорид натрия ≥ 99,5 %

3.3 2,4,6-трихлоранизол (TCA)-d_5 чистота ≥ 98% для GC/MS; 2,6-диброманизол или 2,3,6- трихлоранизол 99 % для GC/MS;

3.4 2,4,6- трихлоранизол (TCA) ≥ 99.0%

3.5 Этанол абсолютный

3.6 Чистая деионизированная вода без TCA (Стандарт EN ISO 3696)

3.7 Водно-спиртовой раствор 12 % об.

Приготовлено с использованием абсолютного этанола (3.5) и деионизированной воды без ТСА (3.6).

3.8 Исходный раствор внутреннего стандарта (500 мг/л)

Добавляют либо 0,050 г 2,4,6-трихлоранизола-d5 (или 2,6-дибромanизола, либо 2,3,6-трихлоранизола (3.3) с концентрацией 500 мг/л (3.8) к примерно 60 мл абсолютного этанола (3.5). После растворения доводят объем до 100 мл с помощью абсолютного этанола (3.5) Можно хранить в стеклянной склянке с металлической или стеклянной крышкой.

3.9 Промежуточный раствор внутреннего стандарта (5,0 мг/л)

Добавляют 1 мл раствора либо 2,4,6-трихлоранизола-d5 (или 2,6-дибромanизола, либо 2,3,6-трихлоранизола) с концентрацией 500 мг/л п. (3.8) примерно к 60 мл абсолютного этанола (3.5).). Доводят объем до 100 мл абсолютным этанолом (3.5). Его можно хранить в стеклянной бутылке с металлической или стеклянной крышкой.

3.10 Раствор внутреннего стандарта (2,0 мкг/л)

Добавляют 40 мкл раствора либо 2,4,6-трихлоранизола-d5 (или 2,6-дибромanизола, либо 2,3,6-трихлоранизола) с концентрацией 5,0 мг/л (3.9) примерно к 60 мл абсолютного этанола (3.5). Доводят объем до 100 мл абсолютным этанолом (3.5). Его можно хранить при температуре окружающей среды в стеклянной бутылке с металлической или стеклянной крышкой.

3.11 Основной раствор стандарта ТСА (40 мг/л)

Добавляют 0,020 г 2,4,6-трихлоранизола примерно к 400 мл абсолютного этанола (3.5). После растворения доводят объем до 500 мл с помощью абсолютного этанола (3.5).

3.12 Промежуточный раствор А стандарта ТСА (80 мкг/л)

Добавляют 1 мл раствора 2,4,6-трихлоранизола с концентрацией 40 мг/л (3.11) примерно к 400 мл абсолютного этанола (3.5). После растворения доводят объем до 500 мл абсолютным этанолом (3.5).

3.13 Промежуточный раствор Б стандарта ТСА (160 нг/л)

Добавляют 1 мл раствора 2,4,6-трихлоранизола с концентрацией 80 мкг/л (3.12) примерно к 400 мл чистой деионизированной воды (3.6). После растворения доводят объем до 500 мл чистой деионизированной водой (3.6).

3.14 Используют метод дополнения стандартов, чтобы составить ряд стандартных растворов TCA. Можно использовать стандартные растворы в диапазоне концентраций от 0,5 нг/л до 50 нг/л путем добавления раствора 2,4,6-трихлоранизола с концентрацией 160 нг/л (3.13) к 6 мл абсолютного этанола (3.5). После растворения доводят объем до 50 мл с помощью чистой деионизированной воды (3.6). Полученную калибровочную кривую следует оценивать регулярно и в случае каждого значительного изменения в системах GC/MS или ГХ/ДЭЗ.

3.15 Газ-носитель: Гелий, хроматографическая чистота (t 99,9990 %).

4. ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

4.1 Лабораторная посуда

4.1.1 Мерная колба на 100 мл

4.1.2 Микрошприц на 100 мкл

4.1.3 Стеклянная банка с широким горлышком вместимости, соответствующей размеру пробы, закрытая стеклянной или металлической пробкой или материалом, не связывающим TCA.

4.1.4 Стеклянная бутыль для проб объемом 20 мл, закрытая перфорированной капсулой и вкладышем с тефлоновым покрытием с одной стороны.

4.2 Твердофазная микроэкстракционная система (SPME) с волокном, покрытым полидиметилсилоксановой пленкой толщиной 100 мкм

4.3 Система нагрева бутыли для проб (4.1.4)

4.4 Система перемешивания для бутыли для проб (4.1.4)

4.5 Газовый хроматограф, оборудованный инжектором для ввода проб с делением/без деления потока и масс-спектрометрическим детектором (МС) или электронозахватным детектором (ЭЗД).

4.6 Система сбора данных

4.7 При необходимости, автоматическая система отбора проб и ввода, работающая с системой SPME

4.8 Капиллярная колонка, покрытая неполярной неподвижной фазой типа фенилметилполисилоксана (например, 5 % фенилметилполисилоксана, толщина пленки 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм или эквивалентная).

5. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Пробки помещают целыми в стеклянную закрытую тару. Вместимость контейнера (4.1.3), такая же, как и количество вина или водно-спиртового раствора (3.1 или 3.7), должна быть выбрана в соответствии с размером образца, при этом убедитесь, что пробки полностью закрыты и погружены в контейнер для мацерации.
Пример 1: 20 пробок (45x24) мм в контейнере объемом 1 л;
Пример 2: 50 пробок (45x24) мм в 2-литровом контейнере.

Большая часть ТСА, высвобождаемая во время мацерации групп пробок, обычно происходит из очень небольшого процента этих пробок. Чтобы получить наилучшее представление о партии пробок, следует провести ряд соответствующих анализов в соответствии с правилами отбора проб и риском загрязнения вина.

6. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1 Экстракция

После мацерации при температуре окружающей среды в течение (24 ± 2) часов в лабораторных условиях мацерацию гомогенизируют путем инверсии. Часть аликвоты 10 мл раствора для мацерации (5) переносят в стеклянную бутыль для проб (4.1.4).

Для повышения эффективности экстракции и последующей чувствительности метода можно добавить примерно 1 г хлорида натрия (3.2). После этого сразу добавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 2,0 мкг/л (3.10), затем бутыль закрывают перфорированной металлической капсулой с силиконовым/тефлоновым покрытием. Капсула обжимается. Содержимое бутыли гомогенизируют в течение 10 минут путем перемешивания с помощью мешалки (4.4) или автоматической системы (4.7).

Бутыль с образцом помещают в систему нагрева (4.3) с температурой 35 ± 2 °C и перемешиванием (4.4). Экстракцию паровой фазы проводят с помощью системы ТФМЭ (4.2) в течение не менее 15 минут.

6.2 Анализ

Затем волокно десорбируют при 260 °C в течение не менее 2 минут в инжекторе газового хроматографа в режиме без разделения потока (4.5). Разделение проводят на капиллярной колонке с неполярной неподвижной фазой (4.8). Газ-носитель – гелий с постоянным расходом 1 мл/мин. В качестве примера приведена

температурная программа от 35 °C (в течение 3 мин) до 265 °C (при 15 °C/мин).

6.3 Детектирование и количественное определение

Детектирование проводят методом масс-спектрометрии с подбором специфических для 2,4,6-трихлоранизола ионов (ионы м/з 195, 210, 212), количественно определяемых по иону м/з 195, и внутреннего стандарта 2,4. ,6-трихлоранизол- d_5 (ионы м/з 199, 215, 217) количественно определяемых по иону м/з 215.

Для определения ECD идентифицируют аналит и внутренний стандарт (2,6-диброманизол или 2,3,6-трихлоранизол) на хроматограмме, сравнив время удерживания пика образца, соответствующего пику стандартного раствора.

7. РАСЧЕТЫ

Площадь хроматографического пика, полученного для 2,4,6-трихлоранизола, корректируют на площадь, полученную для хроматографического пика внутреннего стандарта. Содержание 2,4,6-трихлоранизола в каждом образце получают с помощью калибровочной кривой. Точки на этой кривой получены путем отслеживания относительных откликов 2,4,6-трихлоранизола/внутреннего стандарта, полученных на водно-спиртовые растворы (3.7), содержащих известные концентрации 2,4,6-трихлоранизола, в зависимости от концентрации этих растворов (3.14).

Результаты представлены в нг/л TCF, присутствующих в мацерации, с округлением до ближайших 0,1 нг/л.

8. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

В качестве рекомендации предел обнаружения при анализе мацераций должен быть ниже 0,5 нг/л, а предел количественного определения должен быть близок к 1 нг/л. Коэффициент вариации составляет менее 5% для 5 нг/л, если в качестве внутреннего стандарта выбран дейтерированный аналог TCA-d_5.

Для валидации метода было проведено межлабораторное испытание. Это межлабораторное испытание не проводилось в соответствии с протоколом МОВВ и параметрами валидации, указанными в FV 1224.

9. БИБЛИОГРАФИЯ

HERVÉ E., PRICE S., BURNS G., Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural corks. *ASEV Annual Meeting*. 1999.

ISO standard 20752:2007 Cork stoppers — Determination of releasable 2, 4, 6-trichloroanisol (TCA).

FV 1224 - Résultats de l'analyse collaborative Ring test 3-TCA SPME.

Метод OIV-MA-AS315-17 Тип IV метод

Определение наличия и содержания полихлорфенолов и полихлоранизолов в винах, корковых пробках, древесине и бентонитах, используемых в качестве атмосферных ловушек

(Резолюция OIV-Oeno 374/2009)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Все вина, корковые пробки, бентониты (поглощающие ловушки) и дерево.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Определение 2,4,6-трихлоранизола, 2,4,6-трихлорфенола, 2,3,4,6-тетрахлоранизола, 2,3,4,6-тетрахлорфенола, пентахлоранизола и пентахлорфенола методом газовой хроматографии с введением гексанового экстракта вина и эфирно-гексанового экстракта твердых образцов для анализа и внутренней калибровки.

3. РЕАКТИВЫ

Предварительное замечание: все реагенты и растворители не должны содержать определяемых соединений, перечисленных в п. 2 на пределе обнаружения.

3.1 Чистота гексана > 99 %
3.2 Чистота этилового эфира > 99 %
3.3 Смесь эфир/гексан (50/50; по объему)
3.4 или 2,5-дибромфенол чистотой ≥ 99 %
3.5 Чистый этанол
3.6 Чистая деионизированная вода, не содержащая TCA, тип II в соответствии со стандартом ISO EN 3696.
3.7 50% об. водно-спиртовой раствор. В мерную колбу вместимостью 200 мл (4.9.9) помещают 100 мл абсолютного этанола (3.<5), добавляют 200 мл деионизированной воды (3.6) и гомогенизируют.
3.8 Внутренний стандарт:

3.8.1 Исходный раствор 200 мг/л. Помещают 20 мг внутреннего стандарта (3.4) в градуированную колбу объемом 100 мл (4.9.8), добавляют 50%-ный водно-спиртовой раствор (3.7) и гомогенизируют.

3.8.2 Раствор внутреннего стандарта (2 мг/л). Помещают 1 см исходного раствора внутреннего стандарта (3.8.1) в градуированную колбу объемом 100 мл (4.9.8), добавляют 50%-ный водно-спиртовой раствор (3.7) и гомогенизируют.

3.8.3 Раствор внутреннего стандарта (20 мкг/л). 1 см исходного раствора стандарта (3.8.2) помещают в мерную колбу объемом 100 мл (4.9.8), добавляют 50 % внутреннего водно-спиртового раствора.

3.9 Чистые продукты

3.9.1 2,4,6-трихлоранизол: >99%, cas : 87-40-1

3.9.2 2,4,6-трихлорфенол: >99%, cas: 88-06-2

3.9.3 2,3,5,6-тетрахлоранизол: > 99%, cas: 6936-40-9 (примечание: искомый продукт в образцах представляет собой 2,3,4,6-тетрахлоранизол, но его нет в продаже)

3.9.4 2,3,4,6-тетрахлорфенол: >99%, cas: 58-90-2

3.9.5 пентахлоранизол: > 99%, cas: 1825-21-1.

3.9.6 3.9.6 пентахлорфенол: > 99%, cas: 87-86-5

3.10 Реагенты для получения производных - Пиридин: уксусный ангидрид (1:0,4) об.

3.10.1 Пиридин: > 99%

3.10.2 Уксусный ангидрид: > 98 %

3.11 Стандартный калибровочный раствор с концентрацией 200 мг/л

В градуированную колбу объемом 100 мл (4.9.8) добавляют примерно 20 мг чистых эталонных продуктов (3.9.1-3.9.6), точный вес которых известен (4.7), также добавляют абсолютированный этанол (3.5). Гомогенизируют.

3.12 Промежуточный калибровочный раствор с концентрацией 200 мкг/л

В градуированную колбу объемом 100 мл (4.9.8), наполненную абсолютным этанолом (3.5), добавляют 100 мкл стандартного калибровочного раствора с концентрацией 200 мг/л (3.11) с помощью микрошприца на 100 мкл (4.9.1) и гомогенизируют.

3.13 Калибравочный суррогатный раствор 4 мкг/л

В градуированную колбу объемом 50 мл (4.9.7), содержащую 50 % (по объему) водно-спиртовой раствор (3.7), добавляют 1 мл промежуточного

калибровочного раствора с концентрацией 200 мкг/л (3.11) с помощью пипетки вместимостью 1 мл (4.9.6). Доводят до объема 50 мл чистым этанолом (3.5) и гомогенизируют.

Эту же схему можно использовать для приготовления градуировочных растворов различной концентрации либо с использованием водно-спиртовых растворов, либо вина, либо известного количества чистых продуктов для обогащения экстракционной среды.

3.15 Коммерчески доступный бентонит.

4. ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

4.1 Газофазный хроматограф с инжектором для ввода проб с делением/без деления потока, соединенным с детектором захвата электронов. (Также можно использовать масс-спектрометр)

4.2 Капиллярная трубка из неполярного стационарного фенилметилполисилоксана типа: (0,32 мм x 50 м, толщина пленки 0,12 мкм или эквивалентная)

4.3 Условия проведения хроматографии, в качестве примера:

4.3.1 Впрыск в режиме «разделенный-неразделенный» (время закрытия клапана 30 секунд)

4.3.2 Скорость потока газа-носителя: 30 мл/мин, включая 1 мл в колонке Hydrogen U®[2] (также можно использовать гелий)

4.3.3 Расход вспомогательного газа: 60 мл/мин ± азот хроматографической чистоты (≥ 99,9990 %). Возможно также использование аргона-метана.

4.3.4 Температурный градиент печи для информации::

- от 40°C до 160°C со скоростью 2°C/мин
- от 160°C до 200°C со скоростью 5°C/мин
- ступень при 220°C в течение 10 мин.

4.3.5 Температура инжектора: 250°C

4.3.6 Температура детектора: 250 °C.

4.4 Сбор и интеграция: сбор осуществляется с помощью компьютера. Затем интегрируют пики различных соединений, идентифицированных путем сравнения с эталоном.

4.5 Магнитная мешалка.

4.6 Вортекс с приспособлением для колбы на 30 мл (4.9.3)

4.7 Прецизионные весы с точностью до 0,1 мг

4.8 Ручная или электрическая бытовая решетка

4.9 Лабораторное оборудование:

4.9.1 Микрошприц на 100 мкл

4.9.2 Микрошприц на 10 мкл

4.9.3 Колба вместимостью 30 мл, закрывающаяся навинчивающейся пробкой и крышкой с тефлоновым покрытием с одной стороны.

4.9.4 Пипетка на 10 мл с градуировкой 1/10 мл.

4.9.5 Пипетка на 5 мл с градуировкой 1/10 мл.

4.9.6 Прецизионная пипетка на 1 мл

4.9.7 Градуированная колба объемом 50 мл

4.9.8 Мерная колба на 100 мл

4.9.9 Мерная колба вместимостью 200 мл

4.9.10 Делительная воронка на 100 мл

4.9.11 Пипетки Пастера и подходящие груши для пропипеток

4.9.12 Фольга алюминиевая бытовая в рулонах.

4.9.13 Центрифуга

5. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

5.1 Пробка натирается на терке (4.8) или нарезается на кусочки (размер < 3 мм).

5.2 Древесина режется машинкой для получения кусков (размер < 3 мм)

5.3 Бентонит (3.15) (например, 30 г) распределяют по полоске алюминиевой фольги (4.9.12) размером примерно 30 см x 20 см и подвергают анализу на воздухе не менее 5 дней.

6. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1 Процесс экстракции твердых образцов:

6.1.1 Пробка: в колбу вместимостью 30 мл (4.9.3) помещают примерно 1 г натертой пробки (5.1) точно известного веса (4.7).

6.1.2 Древесина: в колбу вместимостью 30 мл (4.9.3) помещают приблизительно 2 г древесной стружки (5.2) точно известного веса (4.7).

6.1.3 Контрольный бентонит: в колбу вместимостью 30 мл (4.9.3) помещают приблизительно 5 г бентонита (3.15), но точно известной массы (4.7).

6.1.4 Образец бентонита: в колбу вместимостью 30 мл (4.9.3) помещают примерно 5 г бентонита (5.3) точно известного веса (4.7). 6.1.5 Добавляют 10 мл (4.9.4) смеси эфир/гексан (3.3)

6.1.7 Добавляют с помощью микрошприца (4.9.1) 50 мкл раствора внутреннего стандарта (3.8.2)
6.1.8 Перемешивают на вортексе (4.6) в течение 3 мин.
6.1.9 Собирают жидкую фазу эфир/гексана в колбу на 30 мл (4.9.3).
6.1.10 Повторяют операцию экстракции из образца 2 раза, используя по 5 мл смеси эфир/гексана (3.3)
6.1.11 Окончательный экстракт: смешивают 3 фазы эфир/гексана.
6.2 Экстракция вина и калибровочный раствор
6.2.1 Производят отбор 50 мл вина или калибровочного раствора (используя мерную колбу (4.9.7)
6.2.2 Помещают их в мерную колбу объемом 100 мл (4.9.8).
6.2.3 Добавляют с помощью микрошприца (4.9.1) 50 мкл внутреннего стандарта (3.8.3)
6.2.4 Добавляют 4 мл (4.9.5) гексана (3.1)
6.2.5 Проводят экстракцию с помощью магнитной мешалки (4.5) в течение 5 мин.
6.2.6 Переливают в воронку (4.9.10)
6.2.7 Извлекают органическую фазу из эмульсии в колбу объемом 30 мл (4.9.3) и водную фазу в мерную колбу объемом 100 мл (4.9.8).
6.2.8 Повторяют экстракцию вина или калибровочного раствора с использованием 2 мл гексана (3.1).
6.2.9 Проводят экстракцию с помощью магнитной мешалки (4.5) в течение 5 мин.
6.2.10 Переливают в воронку (4.9.10)
6.2.11 Извлекают органическую фазу из эмульсии в той же бутыли емкостью 30 мл, указанной в 6.2.7 (содержащей органическую фазу, полученную в конце первой экстракции).
6.2.12 Эмульсию органической фазы разбивают центрифугированием (4.9.13), удаляя нижнюю водную фазу с помощью пипетки Пастера (4.9.11), снабженной пипеточной грушей.
6.2.13 Конечный винный экстракт и калибровочные растворы: остаточный органический экстракт
6.3 Анализ:
6.3.1 Добавляют к финальному экстракту (6.1.11 or 6.2.13) 100 мкл (4.9.1) реагентов ангидрида пиридина и уксусной кислоты (3.10) для дерифатизации.
6.3.2 Перемешивают магнитной мешалкой (4.5) в течение 10 мин.
6.3.3 Вводят 2 части дериватизированного конечного экстракта (6.3.2) в хроматограф.

7. РАСЧЕТЫ:

$$\text{Концентрация продукта} = \frac{\text{Площадь пика продукта}}{\text{Площадь пика внутреннего стандарта}} * \text{Коэффициент отклика}$$

Коэффициент отклика = концентрация калибровочного раствора (3.13) * (Площадь пика внутреннего стандарта / * (Площадь пика чистого продукта в калибровочном растворе).

Проверяют калибровку, обеспечив коэффициенты отклика +/- 10%.

8. РЕЗУЛЬТАТ

Результаты выражаются в нг/л для вина и нг/г для корковых пробок, бентонитов и древесины.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

9.1 Коэффициент охвата

Коэффициент охвата, рассчитанный по отношению к добавленным количествам древесной щепы, полихлоранизолов и полихлорфенолов 115 нг/г, составляет:

- 2,4,6-трихлоранизол: 96%
- 2,4,6-трихлорфенол: 96%
- 2,3,4,6-тетрахлоранизол: 96%

2,3,4,6-тетрахлорфенол: 97%

- пентахлоранизол: 96%
- пентахлорфенол: 97%

9.2 Воспроизводимость измерений

Параметры неопределённости, рассчитанные для каждого продукта:

В пробке нг/г	**Ср.ар.**	**Ст. откл.**	**Повторяемость**
2,4,6-трихлоранизол	1.2	0.1	0.28
2,4,6-трихлорфенол	26	3.3	9.24
2,3,4,6-тетрахлоранизол	1.77	0.44	1.23
2,3,4,6-тетрахлорфенол	2.59	0.33	0.92

пентахлоранизол	23.3	2.9	8.12
пентахлорфенол	7.39	1.91	5.35

В древесине с 23 нг/г	**Ст. откл.**	**Повторяемость**
2,4,6-трихлоранизол	1.9	5.3
2,4,6-трихлорфенол	1.9	5.3
2,3,4,6-	2.6	7.4
2,3,4,6-тетрахлорфенол	3.3	9.3
пентахлоранизол	2.7	7.5
пентахлорфенол	3.6	10.1

В вине 10 нг/л	**Ст. откл.**	**Повторяемость**
2,4,6-трихлоранизол	0,4	1,1
2,4,6-трихлорфенол	2,1	5,9
2,3,4,6-тетрахлоранизол	0,6	1,7
2,3,4,6-тетрахлорфенол	4	11,2
пентахлоранизол	1,2	3,4
пентахлорфенол	6,5	18,2

В бентоните с 15нг/г	**Ст. откл.**	**Повторяемость**
2,4,6-трихлоранизол	0,9	2,5
2,4,6-трихлорфенол	4	11,2
2,3,4,6-тетрахлоранизол	1,2	3,4
2,3,4,6-тетрахлорфенол	5,2	14,6
пентахлоранизол	4,3	12,0
пентахлорфенол	12,1	33,9

9.3 Пределы обнаружения (DL) и пределы количественного определения (QL), рассчитанные по методу МОВВ:

9.3.1 Дерево

	DL в нг/г	QL в нг/г
2,4,6-трихлоранизол	0.72	2.4
2,4,6-трихлорфенол	0.62	2.0
2,3,4,6-тетрахлоранизол	0.59	2.0
2,3,4,6-тетрахлорфенол	1.12	3.74
пентахлоранизол	0.41	1.4
пентахлорфенол	0.91	3.1

9.3.2 Бентонит

	DL в нг/г	QL в нг/г
2,4,6-трихлоранизол	0.5	1
2,4,6-трихлорфенол	1	3
2,3,4,6-тетрахлоранизол	0.5	1
2,3,4,6-тетрахлорфенол	1	3
пентахлоранизол	0.5	1
пентахлорфенол	Не обн.	Не обн.

9.3.3 Пробка

	DL в нг/г	QL в нг/г
2,4,6-трихлоранизол	0.5	1.5
2,4,6-трихлорфенол	1	2
2,3,4,6-тетрахлоранизол	0.5	1.5
2,3,4,6-тетрахлорфенол	1	2
пентахлоранизол	0.5	1.5
пентахлорфенол	1	2

9.3.4 Вино

	DL в нг/г	QL в нг/г
2,4,6-трихлоранизол	0.3	1
2,4,6-трихлорфенол	1	3
2,3,4,6-	0.3	1
2,3,4,6-тетрахлорфенол	0.3	1
пентахлоранизол	0.5	3
пентахлорфенол	1	3

®[2] Жидкий воздух

Метод OIV-MA-AS315-18 Метод II типа

Анализ биогенных аминов в сусле и вине с помощью HPLC

(Резолюция OIV-Oeno 346/2009)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Этот метод можно применять для анализа биогенных аминов в сусле и вине:
Этаноламин: до 20 мг/л
Гистамин: до 15 мг/л
Метиламин: до 10 мг/л
Серотонин: до 20 мг/л
Этиламин: до 20 мг/л
Тирамин: до 20 мг/л
Изопропиламин: до 20 мг/л
Пропиламин: обычно отсутствует
Изобутиламин: до 15 мг/л
Бутиламин: до 10 мг/л
Триптамин: до 20 мг/л
Фенилэтиламин: до 20 мг/л
Путресцин или 1,4-диаминобутан: до 40 мг/л
2-Метилбутиламин: до 20 мг/л
3-Метилбутиламин: до 20 мг/л
Кадаверин или 1,5-диаминопентан: до 20 мг/л.
Гексиламин: до 10 мг/л

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Измеренные биогенные амины:
Этаноламин: C2H7NO-CAS [141-43-5]
Гистамин: C5H9N3 - CAS [51 - 45 - 6]
Метиламин: CH5N - CAS [74 - 89 - 5]
Серотонин: C10H12N2O - CAS [153 - 98 - 0]
Этиламин: C2H7N-CAS [557-66-4]
Тирамин: C8H11NO - CAS [60 - 19 - 5]
Изопропиламин: C3H9N-CAS [75–31–0]
Пропиламин: C3H9N-CAS [107–10–8]

Изобутиламин: C4H11N-CAS [78-81-9]
Бутиламин: C4H11N - CAS [109 - 73 - 9]
Триптамин: C10H12N2 - CAS [61 - 54 - 1]
Фенилэтиламин: C8H11N - CAS [64 - 04 - 0]
Путресцин или 1,4-диаминобутан: C4H12N2 - CAS [333 - 93 - 7]
2-метилбутиламин: C5H13N-CAS [96-15-1]
3-метилбутиламин: C5H13N-CAS [107–85–7]
Кадаверин или 1,5-диаминопентан: C5H14N2 - CAS [1476 - 39 - 7]
1,6-диаминогексан: C6H16N2 - CAS [124 - 09 - 4]
Гексиламин: C6H15N-CAS [111-26-2]

3. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Биогенные амины определяют непосредственно с помощью HPLC с использованием колонки C18 после дериватизации О-фталевого альдегида (OPA) и флуориметрического обнаружения.

4. РЕАКТИВЫ И ПРОДУКТЫ

4.1 Очень чистая вода с удельным сопротивлением 18 МОм х см
4.2 Дигидрат гидрогенофосфата динатрия - чистота ≥ 99 %
4.3 Ацетонитрил - Минимум пропускания при 200 нм - чистота ≥ 99 %
4.4 О-фталевый альдегид (OPA) — применяемый для флуоресценции — чистота ≥ 99 %
4.5 Декагидрат тетрабората динатрия - чистота ≥ 99 %
4.6 Метанол - чистота ≥ 99 %
4.7 Соляная кислота 32 %
4.8 Гранулы гидроксида натрия – чистота ≥ 99 %
4.9 Этаноламин - чистота ≥ 99 %
4.10 Гистамина дихлоргидрат - Чистота ≥ 99 %
4.11 Этиламина хлоргидрат - чистота ≥ 99 %
4.12 Серотонин - чистота ≥ 99 %
4.13 Метиламин хлоргидрат ± чистота ≥ 98 %.
4.14 Тирамин хлоргидрат - чистота ≥ 99 %
4.15 Чистота изопропиламина ≥ 99 %
4.16 Бутиламин - чистота ≥ 99 %
4.17 Хлоргидрат триптамина - чистота ≥ 98 %.
4.18 Фенилэтиламин - чистота ≥ 99 %

4.19 Дихлоргидрат путресцина - чистота ≥ 99 %
4.20 2-Метилбутиламин - чистота ≥ 98 %
4.21 3-Метилбутиламин - чистота ≥ 98 %
4.22 Кадаверина дихлоргидрат - чистота ≥ 99 %
4.23 1-6-диаминогексан - чистота ≥ 97 %4.24
4.24 Гексиламин - чистота ≥ 99 %
4.25 Азот (максимальные примеси: H2O d 3 мг/л; O2 d 2 мг/л; CnHms d 0,5 мг/л)
4.26 Гелий (максимальные примеси: H2O d 3 мг/л; O2 d 2 мг/л; CnHm d 0,5 мг/л)

Приготовление растворов реагентов:
4.27 Подготовка элюентов
Фосфатный раствор А: взвешивают 11,12 г на 0,01 г двухосновного фосфата натрия (4.2) в 50-мл химическом стакане (5.5) на весах (5.27). Переносят в мерную колбу вместимостью 2 л (5.9) и доводят объем до 2 л очень чистой водой (4.1). Гомогенизируют с помощью магнитной мешалки (5.30) и фильтруют через мембрану 0,45 мкм (5.17). Помещают в 2-литровую бутыль (5.12). Раствор Б: Непосредственно используется ацетонитрил (4.3).
4.28 Раствор ОФА – Ежедневное приготовление
Взвешивают 3,81 г на 0,01 г Na2B4O7·10H2O (4.5) в 25-мл химическом стакане (5.6) на прецизионных весах (5.27). Переносят в мерную колбу объемом 100 мл (5.8) и доводят до 100 мл деминерализованной водой (4.1). Гомогенизируют с помощью магнитной мешалки (5.30), переносят в химический стакан на 150 мл (5.4) и доводят pH до 10,5 с помощью pH-метра (5.28 и 5.29) и 10н соды (4.8).
4.30 Раствор соляной кислоты 0,1 М: В мерную колбу объемом 2 л (5.9) наливают немного деминерализованной воды (4.1). Добавляют 20 мл соляной кислоты (4.7) с помощью автоматической пипетки на 10 мл (5.24 и 5.25).
4.31 Калибровочный раствор в соляной кислоте 0,1 М. Ориентировочная концентрация калибровочного раствора – вес ± 0,1 мг.

	Ориентировочная конечная концентрация в калибровочной смеси в мг/л
Этаноламин	5
Гистамин	5
Метиламин	1
Серотонин	20
Этиламин	2
Тирамин	7
Изопропиламин	4
Пропиламин	2.5
Изобутиламин	5
Бутиламин	5
Триптамин	10
Фенилэтиламин	2
Путресцин	12
2- Метилбутиламин	5
3- Метилбутиламин	6
Кадаверин	13
1.6 Диаминогексан	8
Гексиламин	5

Достоверная концентрация калибровочного раствора записывается с номером партии используемых продуктов.

Некоторые биогенные амины находятся в форме соли, поэтому при определении истинной массы биогенного амина необходимо учитывать вес соли. Исходный раствор готовят в мерной колбе объемом 100 мл (5.8). Раствор заменителя готовят в мерной колбе объемом 250 мл (5.10).

4.32 1.6 Внутренний стандарт на основе диаминогексана

Взвешивают ровно 119 мг в колбе Эрленмейера объемом 25 мл (5.1) на весах (5.26). Переносят в мерную колбу объемом 100 мл (5.8) и доливают до метки с 0,1н соляной кислоты (4.30).

4.33 2-Меркаптоэтанол - Чистота ≥ 99%.

5. ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

5.1 Колбы Эрленмейера вместимостью 25 мл
5.2 Колбы Эрленмейера вместимостью 250 мл
5.3 Стаканы на 100 мл
5.4 Стаканы на 150 мл
5.5 Стакан на 50 мл
5.6 Стакан на 25 мл
5.7 Мерные колбы вместимостью 50 мл
5.8 Мерные колбы вместимостью 100 мл
5.9 Мерные колбы вместимостью 2000 мл
5.10 Мерная колба вместимостью 250 мл
5.11 литровые бутылки
5.12 2-литровая бутылка
5.13 Контейнеры с завинчивающейся крышкой объемом 2 мл, подходящие для устройства смены проб.
5.14 Шприц на 50 мл
5.15 Игла
5.16 Держатель фильтра
5.17 Целлюлозная мембрана 0,45 мкм
5.18 Целлюлозная мембрана 0,8 мкм
5.19 Целлюлозная мембрана 1,2 мкм
5.20 Целлюлозная мембрана 5 мкм
5.21 Целлюлозный предварительный фильтр
5.22 Автоматическая пипетка на 1 мл
5.23 Автоматическая пипетка на 5 мл
5.24 Автоматическая пипетка на 10 мл
5.25 Конусы для автоматических пипеток на 10, 5 и 1 мл
5.26 Система фильтрации
5.27 Весы для взвешивания от 0 до 205 г при ±0,01 мг
5.28 pH-метр
5.29 Электрод
5.30 Магнитная мешалка
5.31 HPLC-насос

5.32 Сменщик-подготовитель с печью

Примечание: без печи не обойтись, если сменщик-препаратор используется для ввода нескольких образцов друг за другом. Эту операцию также можно выполнить вручную. Результаты могут быть менее точными.

5.33 Петлевой дозатор

5.34 Колонка C_{18} 5 мкм, 250 мм x 4 (что должно привести к хроматограмме, аналогичной представленной в приложении B);

5.35 Флуориметрический детектор

5.36 Интегратор

5.37 Пробирка из боросиликатного стекла с пробкой и закрывающим колпачком, покрытым ПТФЭ (бывший Совирел 15).

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы предварительно продувают азотом (4.25).

6.1 Фильтрация

Фильтруют примерно 120 мл образца через мембрану:

- для вина: 0,45 мкм (5,17),
- для сусла или неосветленного вина: 0,45 (5,17) - 0,8 (5,18) - 1,2 (5,19) - 5 мкм (5,20) + предварительный фильтр (5.21), располагают фильтры в следующем порядке, образец фильтруется сверху: 0,45 мкм (5,17) + 0,8 мкм (5,18) + 1,2 мкм (5,19) + 5 мкм (5,20) + предварительная фильтрация (5,21)

6.2 Подготовка образца

Помещают 100 мл пробы (6.1) в мерную колбу вместимостью 100 мл (5.8);
Добавляют 0,5 мл 1-6-диаминогексана (4.32) в концентрации 119 мг/100 мл с помощью автоматической пипетки на 1 мл (5.21 и 25);
Отбирают 5 мл образца с помощью пипетки (5.23 и 5.25); помещают в колбу Эрленмейера вместимостью 25 мл (5.1);
Добавляют к этому (4.6) 5 мл метанола с помощью пипетки (5.23 и 5.25);
Перемешивают до однородности;
Помещают в контейнеры в контейнеры (5.13);
Запускают насос для HPLC (5.31), затем вводят 1 мкл (5.32 и 5.33).

6.3 Дериватизация

В пробирку из боросиликатного стекла (5.37) помещают 2 мл раствора OPA (4.28), 2 мл боратного буфера (4.29), 0,6 мл 2-меркаптоэтанола (4.33). Закрывают, перемешивают (5.30). Открывают и наливают 0,4 мл образца.

Закрывают, перемешивают (5.30). Немедленно вводят в колонку, так как дериватив нестабилен. Промывают посуду сразу после окончания процесса из-за запаха.
Примечание: дериватизацию можно проводить с помощью автоматического пробоотборника. В этом случае процесс будет запрограммирован так, чтобы приблизиться к пропорции ручного вывода

6.4 Регулярная очистка
Шприц (5.13) и иглу (5.14) промывают деминерализованной водой (4.1) после каждого образца;
держатель фильтра (5.16) промывают горячей водой, затем метанолом (4.6). Оставляют стечь и высохнуть.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подвижная фаза (5.31)
- A: фосфатный буфер (4.2)
- B: ацетонитрил (4.3)

Градиентное элюирования:

Время (мин)	% A	% B
0	80	20
15	70	30
23	60	40
42	50	50
55	35	65
60	35	65
70	80	20
95	80	20

Примечание: Градиент можно регулировать для получения хроматограммы, близкой к представленной в приложении Б.
Скорость потока: 1 мл/мин;

Температура колонки: 35°C (5,32);
Детектор (5.35): Exc=356 нм, Em=445 нм (5.30);
Внутренняя калибровка
Калибровочный раствор вводят для каждой серии;

Калибровка по внутреннему стандарту;
Расчет коэффициентов отклика:

RF = Ccis * Площадь i / Площадь is * Cci

Cci = концентрация компонента в калибровочном растворе
Ccis = концентрация внутреннего стандарта в калибровочном растворе (1-6-диаминогексан).
Площадь i = площадь пика продукта, присутствующего в образце
Площадь is = площади пика внутреннего стандарта в образце.

Вычисление концентраций::

Cci = (XF x Площадь i) / (Площадь is x RF) Площадь i = площадь пика продукта, присутствующего в образце
Площадь is = площадь пика внутреннего стандарта, присутствующего в образце
XF = количество внутреннего калибровочного раствора,
добавленного к образцам для анализа
XF = 119 x 0.5/100 = 5.95.

8. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты выражены в мг/л с одной значащей цифрой после запятой.

9. НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

	r (мг/л)	R (мг/л)
Гистамин	0.07x + 0.23	0.50x + 0.36
Метиламин	0.11x + 0.09	0.40x + 0.25
Этиламин	0.34x - 0.08	0.33x + 0.18
Тирамин	0.06x + 0.15	0.54x + 0.13
Фенилэтиламин	0.06x + 0.09	0.34x + 0.03
Диаминобутан	0.03x + 0.71	0.31x + 0.23
2-метилбутиламин и 3-метилбутиламин	0.38x + 0.03	0.38x + 0.03
Диаминопентан	0.14x + 0.09	0.36x + 0.12

Подробности межлабораторных испытаний в отношении надежности метода приведены в приложении А.

10. ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Влияние отдельных компонентов вина: аминокислоты выделяются в начале анализа и не препятствуют обнаружению биогенных аминов.

Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) по данным внутрилабораторного исследования

	LOD (в мг/л)	LOQ (в мг/л)
Гистамин	0,01	0,03
Метиламин	0,01	0,02
Этиламин	0,01	0,03
Тирамин	0,01	0,04
Фенилэтиламин	0,02	0,06
Диаминобутан	0,02	0,06
2-метилбутиламин	0,01	0,03
3-метилбутиламин	0,03	0,10
Диаминопентан	0,01	0,03

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества может осуществляться с использованием сертифицированных эталонных материалов, с винами, характеристикикоторых получены в результате консенсуса, или с обогащенными добавками винами, регулярно включаемых в аналитические серии, и по соответствующим контрольным картам.

Приложение А

Статистические данные, полученные по результатам межлабораторных испытаний

В ходе межлабораторных испытаний были определены следующие параметры. Это исследование было проведено Институтом энологии Бордо (Франция) под контролем Национальной профессиональной комиссией по винам (ONIVINS - Франция)

Год межлабораторных испытаний: 1994 г.

Количество лабораторий: 7

Количество образцов: 9 двойных образцов, выбранных произвольным образом

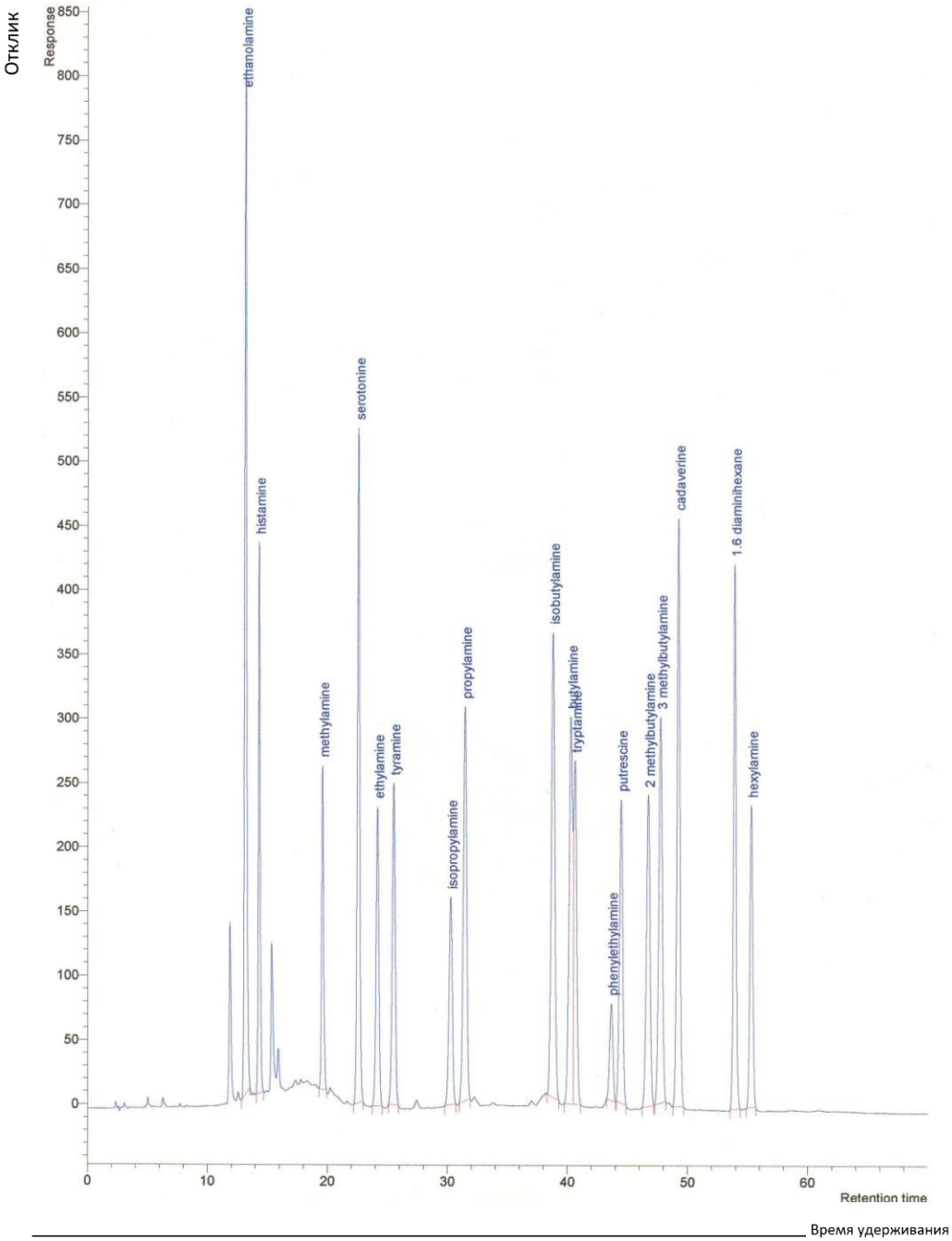
(Bulletin de L'O.I.V. November-December 1994, 765-766, p.916 to 962) результат пересчитан в соответствии со стандартом ISO 5725-2:1994.

Типы проб: белое вино (ВТ), белое вино (ВТ) крепленое = В1, белое вино (БТ) крепленое = В2, красное вино № 1 (RT), красное вино крепленое = R1, красное вино (RT) крепленое = R2, красное вино № 2 (СТ), крепленое красное вино (СТ) = С1 и крепленое красное вино (СТ) = С2. Крепленое в мг/л.

	HistN	MetN	EthN	TyrN	PhEtN	DiNbut	IsoamN	DiNpen
вино В1	вино ВТ + 0,5	vine BT + 0,12	виноВТ + 0,13	вино ВТ + 0,36	вино ВТ + 0,15	вино ВТ + 0,5	вино ВТ + 0,28	виноВТ + 0,25
вино В2	вино ВТ + 2	вино ВТ + 0,40	вино ВТ + 0,50	вино ВТ + 1,44	вино ВТ + 0,60	вино ВТ + 2	Вино ВТ + 0,1,74	вино ВТ + 1,04
вино С1	вино СТ + 2	вино СТ + 0,1	вино СТ + 0,18	вино СТ + 0,72	вино СТ + 0,15	вино СТ + 2	вино СТ + 0,29	вино СТ + 0,26
виноС2	вино СТ + 4	вино СТ + 0,41	вино СТ + 0,50	вино СТ + 2,90	вино СТ + 0,58	вино СТ + 8	вино СТ + 1,14	вино СТ + 1,04
вино R1	вино RT + 2	вино RT + 0,14	вино RT + 0,13	вино RT + 1,45	вино RT + 0,19	вино RT + 3	вино RT + 0,0,57	вино RT + 0,51
вино R2	вино RT + 5	вино RT + 0,41	вино RT + 0,50	вино RT + 2,88	вино RT + 0,59	вино RT + 10	вино RT + 2,28	вино RT + 2,08

HistN: гистамин, MetN: метиламин, EthN: этиламин, TyrN: тирамин, PhEtN: фенилэтиламин, DiNbut: диаминобутан, IsoamN: изоамиламин и DiNpen: диаминопентан.

Приложение В : Модель хроматограммы, полученная этим методом



БИБЛИОГРАФИЯ

TRICARD C., CAZABEIL J.-M., SALAGOÏTI M.H. (1991): Dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, Analusis, 19, M53-M55.

PEREIRA MONTEIRO M.-J. et BERTRAND A. (1994): validation d'une méthode de dosage. Application à l'analyse des amines biogènes du vin. Bull. O.I.V., (765-766), 916-962.

Метод OIV-MA-AS315-19 Метод IV типа

Определение глутатиона в сусле и вине методом капиллярного электрофореза

(Резолюция OIV-Oeno 345/2009)

1. Область применения

Этот метод позволяет определять содержание глутатиона в сусле и вине в диапазоне концентраций от 0 до 40 мг/л. Он использует капиллярный электрофорез (CE), связанный с флуориметрическим методом обнаружением (LIF).

2. Сущность метода

Используемый метод, основанный на капиллярном электрофорезе, представляет собой адаптацию метода, разработанного Ноктором и Фойером (1998) для определения нелетучих тиолов в листьях тополя с использованием HPLC в сочетании с методом флуориметрического обнаружением.
Разделение растворенных веществ смеси методом капиллярного электрофореза достигается за счет дифференциальной миграции в электролите. Капиллярная трубка заполнена этим электролитом.
Образец, который необходимо разделить, вводят в один конец капиллярной трубки. В результате активности электрического поля, создаваемого электродами, погруженными в электролит, растворенные вещества разделяются из-за различий в скорости миграции и обнаруживаются у другого конца капиллярной трубки в виде пиков. В заданных рабочих условиях время миграции является критерием для идентификации химических веществ, а площадь пика пропорциональна впрыскиваемому количеству.

3. Продукты и реактивы

3.1 Список продуктов
3.1.1 Глутатион (GSH, >98%)
3.1.2 Дитиотреитол (DTT, >99%)

3.1.3 Безводный одноосновный фосфат натрия (NaH_2PO_4, > 99%)
3.1.4 Безводный двухосновный фосфат натрия (Na_2HPO_4, > 99%)
3.1.5 2-(N-циклогексиламино)этансульфокислота (CHES, >98%), 3.1.6 Монобромбиман (MBB, 97%)
3.1.7 Натриевая соль этилендиамина тетрауксусной кислоты (EDTA, > 99%).
3.1.8 Гидроксид натрия
3.1.9 Соляная кислота (35%)
3.1.10 Ацетонитрил (99,5%)
3.1.11 Очень чистая вода с удельным сопротивлением >18 МОм х см

3.2 Список растворов
Все растворы гомогенизируются перед использованием.

3.2.13.2.1 Электрофоретический буфер: фосфатный буфер, 50 мМ, pH 7.
Этот буфер готовится с использованием двух растворов - А и Б.
3.2.1.1 Раствор А: 3 мг безводного одноосновного фосфата (3.1.3) растворяют в 250 мл сверхчистой воды (3.1.11).
3.2.1.2 Раствор В: 3,55 мг безводного двухосновного фосфата (3.1.4) растворяют в 250 мл сверхчистой воды (3.1.11).
Фосфатный буфер получают добавлением 40 мл раствора А (3.2.1.1) и 210 мл раствора Б (3.2.1.2), а затем доводят до 500 мл сверхчистой воды (3.1.11). Затем pH буфера доводят до уровня 7 с помощью соляной кислоты (3.1.9).

3.2.2 Раствор монобромбимана (MBB) - 50 мМ
25 мг монобромбимана (MBB) (3.1.6) растворяют в 1850 мкл ацетонитрила (3.1.10).
При хранении в темноте при -20°C этот реагент остается стабильным в течение трех месяцев.

3.2.3 Раствор гидроксида натрия 0,1 М.
0,4 г гидроксида натрия (3.1.8) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 100 мл сверхчистой воды (3.1.11).

3.2.3 Раствор гидроксида натрия 0,1 М.
0,4 г гидроксида натрия (3.1.8) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 100 мл сверхчистой воды (3.1.11).

3.2.4 Раствор гидроксида натрия 5 М.

20 г гидроксида натрия (3.1.8) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 100 мл сверхчистой воды (3.1.11).

3.2.5 Буфер CHES: 0,5 M, pH 9,3.
2,58 г 2-(N-циклогексиламино)этансульфоновой кислоты (CHES) (3.1.5) растворяют приблизительно в 20 мл сверхчистой воды (3.1.11). Уровень pH буфера доводят до 9.3 добавлением 5 M гидроксида натрия (3.2.4). Затем объем доводят до 25 мл сверхчистой водой (3.1.11). Этот буфер распределяют по 1,5 мл пробиркам (типа Эппендорфа) по 1 мл на пробирку. Водный раствор CHES хранится при температуре -20°C в течение нескольких месяцев.

3.2.6 Раствор дитиотреитола (DTT) – 10 мМ
15,4 мг дитиотреитола (3.1.2) растворяют в 10 мл сверхчистой воды (3.1.11), затем этот раствор распределяют по 1,5 мл пробиркам (типа Эппендорфа) по 1 мл на пробирку. Хранят при -20 °C. этот водный раствор ДТТ можно хранить несколько месяцев.

4. Используемое оборудование

4.1 Капиллярный электрофорез
Капиллярный электрофорез, оснащенный инжектором гидростатического типа, соединен с лазерно-индуцированным флуоресцентным детектором с длиной волны возбуждения, аналогичной длине волны поглощения аддукта MBB-GSH: например = 390 нм (например, с использованием детектора Zetalif).

4.2 Капиллярная трубка
Общая длина капиллярной трубки из непривитого кремнезема составляет 120 см. Его эффективная длина составляет 105 см, а внутренний диаметр — 30 мкм.

5. Подготовка образцов

Используемый метод определения состоит в дериватизации функций SH монобромбиманом (MBB) (Radkowsky & Kosower, 1986). Образцы сусла или разливных вин перед анализом осветляют центрифугированием. Бутилированные вина анализируются без предварительного осветления.

Подготовка образцов:
В пробирку объемом 1,5 мл (типа Эппендорф) последовательно помещают:
- 200 мкл образца,
- 10 мкл раствора DTT (3.2.4) - конечная концентрация 0,25 мМ,
- 145 мкл CHES (3.2.3) - конечная концентрация 179 мМ,
- 50 мкл MBB (3.2.2) - конечная концентрация 6,2 мМ.

После перемешивания смеси реагентов для дериватизации тиоловых функций с помощью MBB требуется 20-минутный период инкубации в темноте при температуре окружающей среды. В этих аналитических условиях образующиеся таким образом производные MBB-SR относительно нестабильны; Определение с помощью метода CE-LIF (Капиллярный электрофорез с детектором лазер-индуцированной флуоресценции) следует проводить сразу после инкубации.

6. Проведение исследования

6.1 Подготовка капиллярной трубки

Перед первым использованием и по мере увеличения времени миграции с капиллярной трубкой (4.2) следует обращаться следующим образом:
6.1.1. Промыть 0,1 М раствором гидроксида натрия (3.2.5) в течение 3 минут,
6.1.2. Промыть сверхчистой водой (3.1.12) в течение 3 минут,
6.1.3. Промыть электрофоретическим фосфатным буфером (3.2.1) в течение 3 минут.

6.2 Условия миграции

6.2.1 Ввод пробы гидростатический; 3 с при 50 кПа.
За этим следует инъекция 50 мБ буфера для электрофореза (3.2.1) для улучшения разрешения пиков (разбивка).

6.2.2 Анализ.
Напряжение +30 кВ, приложенное на всем протяжении разделения, генерирует ток 47 мкА. Эти условия достигаются за 20 с. Разделение проводят при постоянной температуре 21 °C.

6.2.3 Промывка капиллярной трубки

Капиллярную трубку следует промывать после каждого анализа последовательно используя:
- 0,1М раствор гидроксида натрия (3.2.5) в течение 3 минут,
- сверхчистую воду (3.1.12) в течение 3 минут,
- электрофоретический фосфатный буфер (3.2.1) в течение 3 минут.

7. Результаты

При той концентрации, которая в конечном итоге используется в образце, присутствие DTT во время дериватизации позволяет стабилизировать неустойчивые функции тиолов, имеющих щелочной pH и очень легко окисляемых хинином, образующимся при автоокислении фенольных соединений, но не нарушает дисульфидные связи. Таким образом, в этих аналитических условиях содержание восстановленного глутатиона (GSH) в вине с добавлением или без добавления 10 мг/л окисленного глутатиона (GSSG) строго сопоставимо (рис. 1). Таким образом, этот метод позволяет определять содержание глутатиона только в его восстановленной форме.

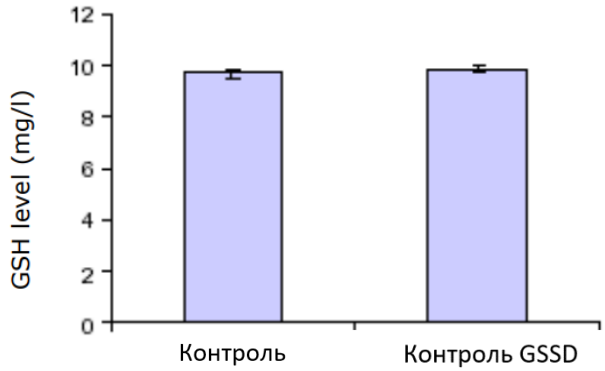


Рисунок 1: Демонстрация стабильности дисульфидных связей в соответствии с описанными условиями дериватизации. (DTT, максимально 0,25 мМ)

На рис. 2 показан электрофоретический профиль образца сусла из белого винограда (Совиньон), в котором идентифицированы цистеин, глутатион, N-ацетилцистеин и диоксид серы. Первый пик соответствует избытку реагентов (DTT, MBB). Выделение нелетучих тиолов занимает менее 20 минут. Удалось идентифицировать лишь отдельные пики (рис. 2, A) (Newton et al., 1981). Эти тиолы, помимо диоксида серы, обычно присутствуют в различных количествах в винограде (Cheynier et al., 1989), фруктах и овощах (Mills et al., 2000).

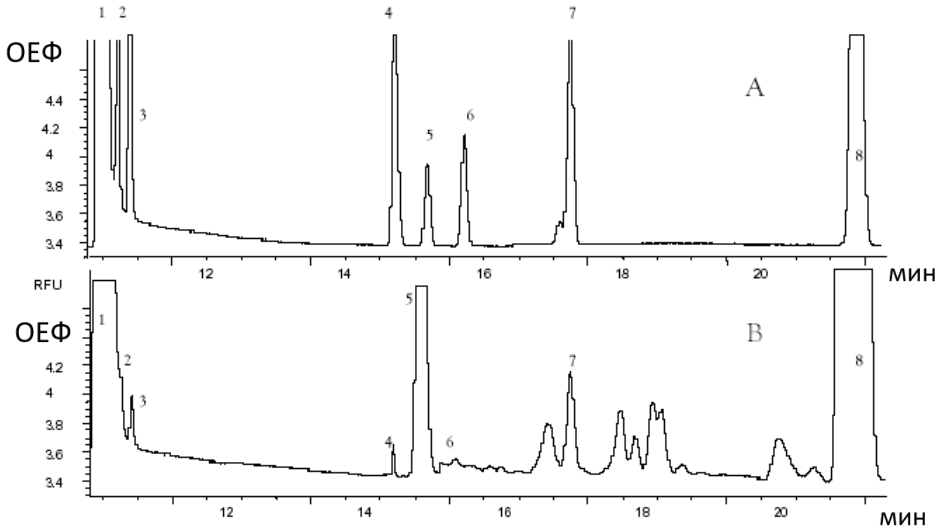


Рисунок 2: Пример разделения известных нелетучих тиолов в растворе HCl/EDTA (A) 1 и в виноградном сусле (B): ДТТ; 2: гомоцистеин; 3: цистеин; 4: Cys-Gly; 5: GSH; 6: g Glu-Cys; ,7: NAC; 8: SO_2

В этих аналитических условиях время удерживания аддукта MBB-RS было следующим: MBB-гомоцистеин 10,40 мин; МББ-цистеин 10,65 мин, MBB-GSH 14,14 мин; MBB-NAC 15,41 мин.; MBB-SO2 18,58 мин.

8. Характеристики метода

Были выявлены определенные внутренние элементы валидации, но они не представляют собой формальную валидацию в соответствии с протоколом разработки, проведения и интерпретации методов исследований эффективности анализа (OIV 6/2000).

Вино используется в качестве матрицы для построения калибровочных кривых и тестов воспроизводимости для каждого соединения. Каждую

концентрацию рассчитывают из среднего значения трех определений, полученных с использованием линии регрессии калибровочной кривой. Результаты выражаются в мг/л.
Линейные регрессии и коэффициенты корреляции рассчитываются по методу наименьших квадратов. Исходные растворы различных тиолов производятся из раствора HCl/EDTA, что позволяет хранить их при +6 °C в течение нескольких дней без потерь. Последовательные разбавления этих растворов позволяют оценить пороговые пределы обнаружения в вине при соотношении сигнал/шум, равном трем и более. Спектр линейности варьируется в зависимости от
тиолов (таблица 1).

Таблица 1: Спектр линейности, свойства линейной регрессии для каждого тиола в растворах, приготовленных точно так же, как и для глутатиона.

	Линейность спектра	Линейная регрессия	Коэффициент корреляции
Гомоцистеин	0 - 15 мг/л	$Y = 0.459X \pm 0.231$	0.9987
Цистеин	0 - 15 мг/л	$Y = 0.374X \pm 0.131$	0.9979
Глутатион	0 - 40 мг/л	$Y = 0.583X \pm 0.948$	0.9966
N-ацетилцистеин	0 - 10 мг/л	$Y = 0.256X \pm 0.085$	0.9982

Эти аналитические условия позволяют исключить помехи, вызванные продуктами гидролиза МВВ, в отличие от результатов других работ (Ivanov et al., 2000). Повторяемость метода рассчитывается на основе десяти анализов одного и того же образца вина. При концентрации тиола 10 мг/л коэффициент вариации для глутатиона составляет 6,0 %; кроме того, она составляет 3,2 % для гомоцистеина, 4,8 % для цистеина и 6,4 % для N-ацетилцистеина. Предел обнаружения глутатиона составляет 20 мкг/л, предел количественного определения – 60 мкг/л.

9. Библиография

Noctor, G. and C. Foyer, 1998. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione, *Analytical Biochemistry*, **264**, 98-110.

Kosower, N.S., Kosower E. M., Newton G. L.,and Ranney H. M., 1979. Bimane fluorescent labels: Labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76** (7), 3382-3386.

Newton, G.L., R. Dorian, and R.C. Fahey, *Analysis of biological thiols: derivatisation with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography.* Anal. Biochem., 1981. **114**: p. 383-387.

Cheynier, V., J.M. Souquet, and M. Moutounet, 1989. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamique acid ration in Vitis vinifera grapes and musts. *Am. J.Enol.Vitic*,. **40** (4), 320-324.

Mills, B.J., Stinson C. T., Liu M. C. and Lang C. A., 1997. Glutathione and cyst(e)ine profiles of vegetables using high performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Journal of food composition and analysis,* **10**, 90-101.

Ivanov, A.R., I.V. Nazimov, and L. Baratova, 2000. Determination of biologically active low molecular mass thiols in human blood. *Journal of Chromatogr. A*,. **895**, 167-17

Метод определения α-дикарбониловых соединений вина с помощью ВЭЖХ после дериватизации 1,2-диаминобензолом (OIV-Oeno 386A-2010)

Метод OIV-MA-AS315-20 Метод IV типа

1. Введенение

Основными α-дикарбонильными соединениями, обнаруженными в вине (рис. 1), являются: глиоксаль, метилглиоксаль, диацетил и пентан-2,3-дион, но только α-дикетоны имеют относительно большое содержание в вине. Карбонильные соединения присутствуют во всех типах вин, особенно после малолактической ферментации и в красных винах. Кроме того, сладкие белые вина, произведенные из ботритизированного винограда, могут содержать высокие уровни глиоксаля и метилглиоксаля.

Глиоксаль: OCH – CHO (этандиол)
Метилглиоксаль: CH_3– CO– CHO (2-оксопропаналь)
Диацетил: CH_3– CO– CO– CH_3 (2,3-бутандион)
2,3-Пентандион: CH_3– CH_2– CO– CO– CH_3
2,3-Гексанедион: CH_3– CH_2– CH_2– CO– CH_3

Рисунок 1. Основные α-дикарбонильные соединения вина (2,3-гександион не присутствует в вине в естественном виде, но используется в качестве внутреннего стандарта).

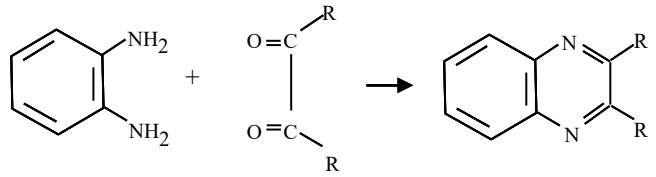
Дикарбонильные соединения имеет большое значение благодаря их сенсорному воздействию, быстрому взаимодействию с другими компонентами вина или возможному микробиологическому воздействию.

2. Область применения

Данный метод применяется ко всем типам вин (белые, красные, сладкие или крепленые) с содержанием дикарбонильных соединений в объеме от 0,05 мг/л до 20 мг/л.

3. Сущность метода

Метод основан на образовании производных хиноксалинового типа на основе α-дикарбонильных соединений вина с 1,2-диаминобензолом (Рисунок 2).



1,2-диаминобензол дикарбонил хиноксалин

Рисунок 2. Образование производных

Реакция происходит непосредственно в вине при pH равному 8 и после 3 часовой реакции при температуре 60°C. Анализ производных впоследствии проводится непосредственно с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и детекции с помощью УФ-поглощения при 313 нм.

4. Реагенты и продукты

4.1 Дикарбонильные соединения

4.1 Дикарбонильные соединения
4.1.1 Глиоксаль в 40% растворе (CAS N° 107-22-3)
4.1.2 Метилглиоксаль в растворе 40% (CAS N° 78-98-8)
4.1.3 Диацетил, чистота > 99% (CAS N° 431-03-8)
4.1.4 2,3-Пентандион, чистота > 97% (CAS N° 600-14-6)
4.1.5 2,3-гексанедион, чистота > 90% (CAS N° 3848-24-6)

4.2 1,2-диаминобензол в виде порошка, чистота > 97%

4.3 Вода для ВЭЖХ (сверхчистая, с удельным сопротивлением 18.2 МОм) (CAS N° 95-54-5)

4.4 Чистый этанол для ВЭЖХ (CAS N° 64-17-5)

4.5 Гидроксид натрия М (CAS N° 1310-73-2)

4.6 Чистая кристаллизующаяся уксусная кислота (CAS N° 64-19-7)

4.7 Растворитель А для анализа методом ВЭЖХ

К 1 литру воды для ВЭЖХ (4.3) добавляют 0,5 мл уксусной кислоты (4.8), перемешивают, дегазируют (например, с помощью ультразвука).

4.8 Растворитель В для ВЭЖХ

Чистый метанол для ВЭЖХ (CAS N° 67-56-1)

4.9 Водно-спиртовой раствор 50% об.

Смешивают 50 мл чистого этанола для ВЭЖХ (4.4) с 50 мл воды (4.3).

4.10 Раствор внутреннего стандарта 2,3-гександиона в объеме 2,0 г/л

Помещают 40 мг 2,3-гексанедиона (4.2) в колбу емкостью 30 мл, разбавляют в 20 мл водно-спиртового раствора до 50% объема (4.9) и перемешивают до полного растворения.

5. Оборудование

5.1 Высокоэффективный жидкостный хроматограф с УФ-детектированием и регистрацией поглощения (313 нм);

5.1.1 Аналитическая колонка, заполненная 5 мкм октадецил-силикагеля, размеры которой составляют 250 мм x 4,6 мм.

5.1.2 Система сбора данных.

5.2 Аппарат для измерения pH.

5.3 Магнитная мешалка.

5.4 Весы с точностью до 0,1 мг.

5.5 Система дегазации растворителя для ВЭЖХ (например, ультразвуковая ванна).

5.6 Рабочая печь, которую можно настроить на 60°C.

5.7 Стандартная лабораторная стеклянная тара, включая пипетки, колбы емкостью 30 мл с винтовыми крышками и микрошприцы

6. Подготовка образца

Специальной подготовки не требуется.

7. Проведение исследования

Помещают 10 мл вина в колбу емкостью 30 мл (5,7).
С помощью гидроксида натрия M (4,5), помешивая, доводят до pH равному 8
Добавляют 5 мг 1,2-диаминобензола (4.2)
Добавляют 10 мкл 2,3-гександиона (внутренний стандарт) в концентрации 2,0 г/л (4.10)
Закрывают колбу завинчивающейся крышкой с тефлоновым уплотнением.
Перемешивают до полного исчезновения реагента (5.3)
Помещают в печь при 60°C на 3 ч (5.6)
Охлаждают.

7.1 Оптимизация и аналитические условия
Выход реакции дикарбонильных соединений с 1-2- диаминобензолом оптимален при уровне pH равному 8. Растворы дикарбонильных соединений были дериватизированы при 25, 40 или 60°C и затем проанализированы с помощью ВЭЖХ в соответствии с протоколом, описанным в пункте 7.2, в разное время (Таблица 1).
Дикетоны требуют гораздо большего времени реакции и более высокой температуры. Реакция протекает медленнее с молекулами, имеющими более длинные цепи (2,3-пентандион и 2,3-гександион).
Кроме того, при изучении метода не было отмечено вмешательства SO_2 в процесс образования хиноксалинов.

Таблица 1. Влияние времени и температуры реакции на образование производных диаминобензола из глиоксаля, диацетила и 2,3-гексанедиона

		Время реакции		
		1ч	2ч	3ч
	Температура (°C)	Скорость восстановления (%)		
Глиоксаль	25	92	93	94
	40	95	97	98
	60	96	98	100
Диацетил	25	23	77	87
	40	64	89	94
	60	85	100	100
2,3-Гексанедион	25	17	67	79
	40	55	79	88
	60	69	93	100

7.2 Анализ с помощью ВЭЖХ

- *Инжекция.* После охлаждения непосредственно в систему ВЭЖХ вводится 20 мкл реакционной среды, содержащей хиноксалины.
- *Программа элюирования.* Программа элюирования при разделении представлена в таблице 2

Таблица 2. Программа элюирования для анализа методом ВЭЖХ

Время в минутах	растворитель А	растворитель В
0	80	20
8	50	50
26	25	75
30	0	100
32	0	100
40	100	0
45	80	20
50	80	20

Скорость потока составляет 0,6 мл/мин
- *Разделение.* Хроматограмма, полученная с помощью ВЭЖХ, показана на рисунке 3.
- *Обнаружение.* Максимальная абсорбция была исследована для всех дериватизированных дикарбонильных соединений при 313 нм и будет считаться оптимальной.
- *Идентификация производных.* Идентификация производных проводилась путем сравнения времени удерживания со стандартными эталонными растворами. Хроматографические условия позволяют хорошо разделять пики во всех винах.

7. 2.1 Характеристика метода ВЭЖХ

Было определено несколько методов внутренней валидации, но не один не принят в соответствии с протоколом, регулирующим планирование, проведение и интерпретацию исследований эффективности, относящихся к методам анализа (OIV 6/2000).
- Повторяемость. Повторяемость метода была рассчитана при помощи 10 анализов одного и того же вина (Таблица 3).
Таблица 3. Исследование повторяемости и эффективность метода

	Среднее значение*	Стандартное отклонение	CV (%)
Белое вино			
Глиоксаль	4.379	0.101	2.31
Метилглиоксаль	2.619	0.089	3.43
Диацетил	5.014	0.181	3.62
2.3- Пентандион	2.307	0.097	4.21
Красное вино			
Глиоксаль	2.211	0.227	10.30
Глиоксаль	1.034	0.102	9.91
Диацетил	1.854	0.046	2.49
2,3- Пентандион	0.698	0.091	13.09

* Результаты в мг/л получены на основе 10 анализов одного и того же вина.

- *Линейность.* Линейность метода была проверена с помощью стандартных растворов (с использованием водно-спиртового раствора 12 об. % в качестве стокового) (Таблица 4). Количественный анализ добавок дикарбонильных соединений показал, что метод является линейным для четырех соединений, и его точность является удовлетворительной.

Таблица 4. Исследование линейности и реакции восстановления со стандартными растворами (вода-этанол при 12 % об.) Значение коэффициента корреляции

Глиоксаль значение[a] площадь пика[b]	Метилглиоксаль значение[a] площадь пика[b]	Диацетил значение[a] площадь пика [b]	Пентан-2,3-дион значение[a] площадь пика[b]
R = 0.992	R = 0.997	R = 0.999	R = 0.999

- *Восстановление* добавок, проведенное в красных и белых винах, продемонстрировало удовлетворительную эффективность метода. Содержится в диапазоне 92% - 116% для экстремальных значений

- *Предел количественного определения* дикарбонильных соединений очень низкий, наилучшие результаты получены с диацетилом, предел обнаружения которого в 10 раз ниже чем у других соединений (Таблица 5).

Таблица 5. Эффективность метода ВЭЖХ для количественного определения дикарбонильных соединений

Пределы	выявление [a]	определение[a]	количественное определение [a]
Глиоксаль	0.015	0.020	0.028
Метилглиоксаль	0.015	0.020	0.027
Диацетил	0.002	0.002	0.003
Пентан-2,3-дион	0.003	0.004	0.006

а: результаты в мг/л, водно-спиртовой раствор (10% об.).

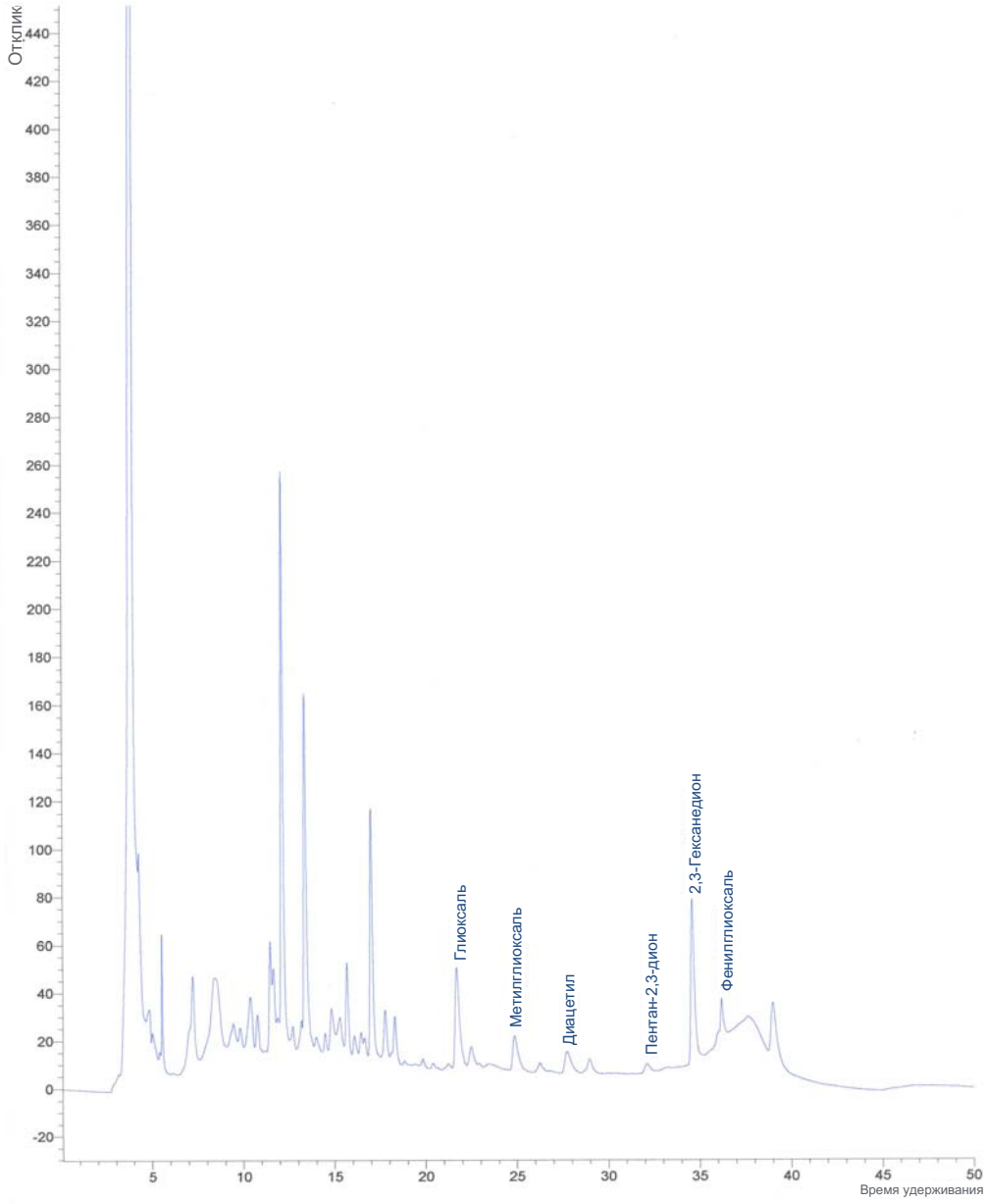


Рисунок 3. Высокоэффективная жидкофазная хроматограмма дикарбонильных соединений, дериватизированных 1,2-диаминобензолом из белого вина, обнаруженных УФ при поглащении 313 нм.
Колонка Spherisorb ODS Column 250 мм x 4,6 мм x 5 мкм.

Библиография

Bartowski E.J. and Henschke P.A., The buttery attribute of wine – diacetyl – desirability spoilage and beyond. Int. J. Food Microbiol. 96: 235-252 (2004).

Bednarski W., Jedrychowski L., Hammond E., and Nikolov L., A method for determination of D-dicarbonyl compounds. J. Dairy Sci. 72:2474-2477 (1989).

Leppannen O., Ronkainen P., Koivisto T. and Denslow J., A semiautomatic method for the gas chromatographic determination of vicinal diketones in alcoholic beverages. J. Inst. Brew. 85:278- 281 (1979).

Martineau B., Acree T. and Henick-Kling T., Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. Food Res. Int. 28:139-143 (1995).

Moree-Testa P. and Saint-Jalm Y., Determination of D-dicarbonyl compounds in cigarette smoke. J. Chromatogr. 217:197-208 (1981).

De Revel G., Pripis-Nicolau L., Barbe J.-C. and Bertrand A., The detection of α-dicarbonyl compounds in wine by the formation of quinoxaline derivatives. J. Sci. Food Agric. 80:102-108 (2000).

De Revel G. and Bertrand A., Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes. Proc. 7th Weurman Flavour Research Symp, Zeist, June, pp 353-361 (1994).

De Revel G. and Bertrand A., A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. J. Sci. Food Agric. 61:267-272 (1993).

Voulgaropoulos A., Soilis T. and Andricopoulos N., Fluorimetric determination of diacetyl in wines after condensation with 3,4-diaminoanisole. Am. J. Enol. Vitic. 42:73-75 (1991).

Gilles de Revel et Alain Bertrand Analyse des composés α-dicarbonyles du vin après dérivation par le 2,3-diaminobenzène OIV FV 1275

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ α-ДИКАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ВИНА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПОСЛЕ ДЕРИВАТИЗАЦИИ 1,2-ДИАМИНОБЕНЗОЛОМ

(OIV-Oeno 386B-2010)

Метод OIV-MA-AS315-21 Тип метода: IV

1. Введение

Основными α- карбонильными соединениями, обнаруженными в вине (рис. 1), являются: глиоксаль, метилглиоксаль, диацетил и 2,3-пентандион, но в основном в вине присутствуют только α-дикетоны. Карбонильные соединения присутствуют во всех типах вина, особенно после малолактической ферментации и в красных винах. Кроме того, сладкие белые вина, произведенные из ботритизированного винограда, могут иметь высокие содержания глиоксаля и метилглиоксаля.

Глиоксаль: OCH–CHO (этанедиал)
Метилглиоксаль: CH_3–CO–CHO (2- оксопропаналь)
Диацетил: CH_3–CO–CO–CH_3 (2,3- бутандион)
Пентан-2,3-дион: CH_3–CH_2–CO–CO–CH_3
2,3-Гексанедион: CH_3–CH_2–CH_2–CO–CO–CH_3

Рисунок 1. Основные α-дикарбонильные соединения вина (2,3-гексанедион не присутствует в вине в естественном виде, но используется в качестве внутреннего стандарта).

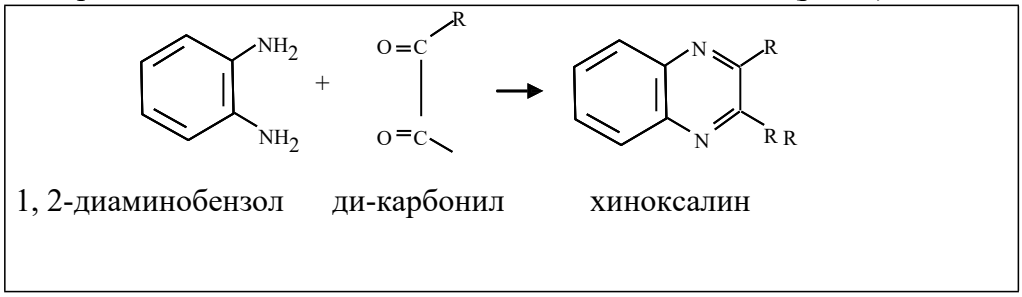
Дикарбонильные соединения играют важную роль благодаря их влиянию на сенсорные характеристики вина, способности к быстрому взаимодействию с другими компонентами вина или возможному микробиологическому воздействию.

2. Область применения

Данный метод применяется ко всем типам вин (белые, красные, подслащенные или крепленые), для поддержания карбонильных производных в диапазоне от 0,05 мг/л до 20 мг/л.

3. Сущность метода

Метод основан на образовании производных хиноксалинового типа из α-дикарбонильных соединений вина и 1,2-диаминобензола (рис. 2)



1, 2-диаминобензол ди-карбонил хиноксалин

Рисунок 2 Образование производных веществ

Реакция происходит непосредственно в вине при уровне pH равном 8 и после продолжения реакции в течение 3 часов при температуре 60°C. Анализ производных проводится после экстракции производных дихлорметаном и анализа методом газовой хроматографии с детектированием с помощью масс-спектрометрии (ГХ-МС) или с использованием азотспецифического детектора.

4. Реагенты и продукты

4.1 Дикарбонильные соединения
4.1.1 Глиоксаль в 40% растворе (CAS № 107-22-3)
4.1.2 Метилглиоксаль в растворе 40% (CAS №78-98-8)
4.1.3 Диацетил, чистота > 99% (CAS № 431-03-8)
4.1.4 2,3-Пентандион, чистота > 97% (CAS № 600-14-6)
4.1.5 2,3-Гексанедион, чистота > 90% (CAS № 3848-24-6)
4.2 1,2-Диаминобензол в виде порошка, чистота > 97% (CAS № 95-54-5

4.3 Вода для ВЭЖХ (например, микрофильтрованная и с удельным сопротивлением 18,2 Мом)
4.4 Чистый этанол для ВЭЖХ (CAS № 64-17-5)
4.5 Гидроксид натрия М. (CAS № 1310-73-2)
4.6 Серная кислота 2М (CAS № 7664-93-9)
4.7 Дихлорметан (CAS № 75-09-2)
4.8 Сульфат натрия безводный (CAS № 7757-82-6)
4.9 Водно-спиртовой раствор при 50% об.
Смешивают 50 мл чистого этанола для ВЭЖХ (4.4) с 50 мл воды (4.3)
4.10 Раствор внутреннего стандарта 2,3-гексанедиона в концентрации 2,0 г/л.
Помещают 40 мг 2,3-гександиона (4.2) в колбу емкостью 30 мл, разводят в 20 мл водно-спиртового раствора до 50% об. (4.9) и перемешивают до полного растворения.
4.11 Сульфат натрия безводный (CAS № 7757-82-6)

5. Оборудование

5.1 Газовый хроматограф с детектированием методом масс-спектрометрии (ГХ-МС) или детектор азота.
5.1.1 Относительно полярная, полиэтиленгликолевая капиллярная колонка (CW 20M, BP21 и т.д.) со следующими характеристиками (в качестве примера): 50 м×0,32 мм × 0,25мкм.
5.1.2 Система сбора данных.
5.2 Аппарат для измерения pH
5.3 Магнитная мешалка
5.4 Весы с точностью до 0,1 мг.
5.5 Духовка, которая может быть установлена на 60°C
5.6 Стандартная лабораторная стеклянная посуда, включая пипетки, колбы с завинчивающимися крышками и микрошприцы.

6. Подготовка образца

Специальная подготовка не требуется

7. Проведение исследования

Помещают 50 мл вина в колбу (5.6)

Доводят до уровня pH 8, перемешивая с гидроксидом натрия M (4,5)
Добавляют 25 мг 1,2- диаминобензола (4,2)
Добавляют 50 мкл 2,3-гександиона (внутренний стандарт) в концентрации 2,0 г/л (4.10) Закрывают колбу завинчивающейся крышкой с тефлоновым уплотнением.
Перемешивают до полного исчезновения реагента (5.3)
Помещают в печь с температурой 60°C на 3 часа 5.5)
Охлаждают.
7.1 Оптимизация и аналитические условия (данное исследованиепроводилось методом ВЭЖХ, см. этот метод)

Выход образования производных дикарбонильных соединений с 1-2-диаминобензолом оптимален при уровне pH 8 при 60°C после трех часов реакции
Кроме того, при исследовании метода не было отмечено вмешательства SO_2 в образование хиноксалинов.

7.2 Анализ по ГК

7.1.1 Экстракция хиноксалинов
- Доводят реакционную среду, приготовленную в пункте 7, до уровня pH 2 с помощью H_2SO_4 2M (4.6);
- Экстрагируют 2 раза по 5 мл дихлорметана (4,7) при магнитном перемешивании в течение 5 минут;
- Каждый раз декантируют нижнюю фазу;
- Смешивают две фазы растворителя;
- Высушивают с помощью 1 г безводного сульфата натрия (4.11);
- Декантируют.

7.2.2 Хроматографический анализ (приводится в качестве примера)
- *Обнаружение.* Для анализа методом ГХ-МС газовый хроматограф Hewlett Packard HP 5890 был соединен с программным обеспечением Chemstation и масс-спектрометром HP 5970 (электронное воздействие 70eV, 2,7 кВ),
Примечание: Также можно использовать детектор азота
- *Колонка.* Колонка типа BP21 (SGE, 50 м x 0,32 мм x 0,25мкм).
- *Температуры.* Температура инжектора и детектора составляет соответственно 250°C и 280°C; температура печи поддерживается при 60°C в течение 1 мин, затем запрограммировано увеличение со скоростью 2°C/мин. до 200 °C.

Окончательный изотермический период длится 20 мин.
- *Ввод.* Объем вводимого вещества составляет 2 мкл, а время работы клапанов инжектора без разделения - 30 с.

7.2.3 Анализ образующихся хиноксалинов

- *Разделение.* Хроматограмма производных из вина, полученного с помощью 1,2-диаминобензола, с использованием мониторинга выбранных ионов (SIM) показана на рисунке 3. Оптимальное разделение было получено со всеми типами вин (белые, красные, подслащенные или крепленые), включая бродильные сусла.

- *Идентификация пиков*. Для идентификации дериватизированных из вина дикарбонильных соединений при помощи ГХ-МС был применен метод общего ионного тока (сканирования), который применяется дляполучения масс-спектров дериватизированных хиноксалинов и сравнения их с референтными данными; кроме того, время удерживания сравнивали с аналогичным для чистых соединений, обработанных таким же образом. В таблице 1 приведены основные ионы масс-спектров, полученных из дериватизированных дикарбонильных соединений.

- *Определение*. Количественное определение дикарбонильных соединений проводят методом SIM, выбирая ионы, у которых m/z = 76, 77, 103, 117, 130, 144, 158 и 171. Ионы, у которых m/z = 76 и 77, используются для количественного определения, а остальные - в качестве классификаторов, т.е. глиоксаль: ионы с m/z = 103 и 130, метилглиоксаль: ионы с m/z = 117 и 144, диацетил: ионы с m/z = 117 и1 58, 2,3-пентандион: ионы с m/z = 171 и 2,3-гександион: ионы с m/z = 158 и 171.

7.2.4 Характеристика метода

Были определены элементы внутренней валидации, но они не относятся к результатам официальной валидации в соответствии с протоколом, регулирующим планирование, проведение и интерпретацию исследований производительности, относящихся к методам анализа (OIV 6/2000).
- *Повторяемость*. Повторяемость метода ГХ-МС-СИМ показывает коэффициенты вариации в пределах от 2 до 5% для четырех дикарбонильных соединений;
- *Степень восстановления*. Количества, добавленные в вино, были

восстановлены с коэффициентом восстановления от 92 до 117%;
- *Линейность.* Линейные корреляции были получены в диапазоне концентраций от 0,05 до 20 мг/л.
- *Предел обнаружения*. Предел обнаружения большинства дериватизированных дикарбонильных соединений с использованием вина в качестве матричного раствора составляет 0,05 мг/л.

Таблица 1. Масс-спектры (m/z иона и численность иона по отношению к иону основного пика) производных дикарбонильных соединений с использованием 1,2-диаминобензола

Дикарбонил состав	Дериватив	Масс-спектр (основные ионы и количество соединений)
Глиоксаль	Хиноксалин	130 (100), 103 (56.2), 76 (46.8), 50 (20.2), 75 (10.4), 131 (9.4)
Метилглиоксаль	2-Метилхиноксалин	144 (100), 117 (77.8), 76 (40.5), 77 (23.3), 50 (21.9), 75 (11.3), 145 (10.3)
Диацетил	2,3-Диметилхиноксалин	117 (100), 158 (75.6), 76 (32.3), 77 (23.1), 50 (18.3), 75 (10.4)
2,3-Пентандион	2-Этил-3-метилхиноксалин	171 (100), 172 (98), 130 (34.1), 75 (33.3), 77 (21), 50 (19.4), 144 (19), 143 (14.1), 103 (14)
2,3-Гексанедион	2,3-Диэтилхиноксалин	158 (100), 171 (20.1), 76 (13.7), 77 (12.8), 159 (11.4), 157 (10.8),50 (8.1)

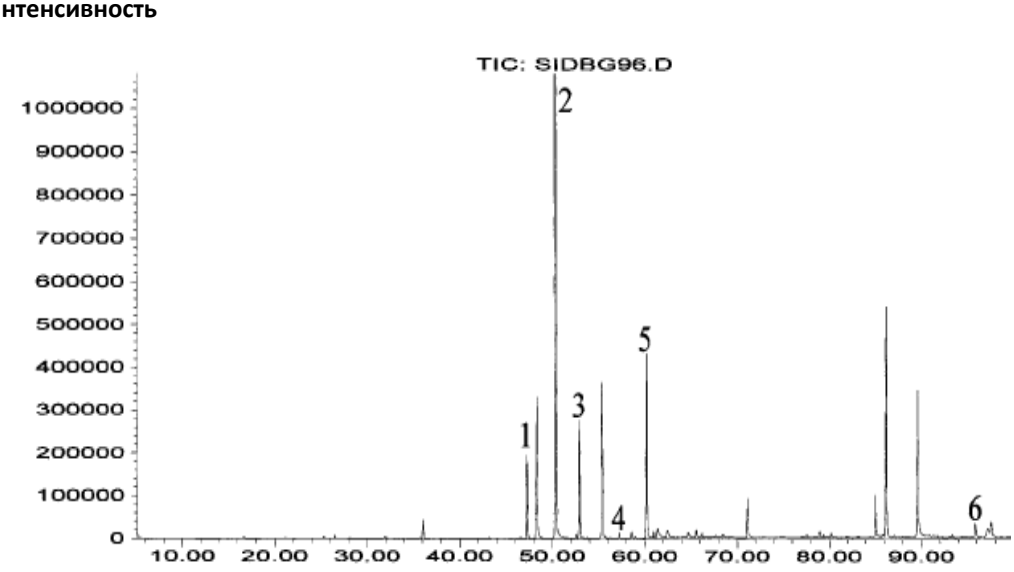


Figure 3. Рисунок 3. Газовая хроматограмма экстракта из дикарбонильных соединений, дериватизированных 1,2-диаминобензолом из белого вина, обнаруженного методом масс-спектрометрии путем отбора ионов m/z = 76, 77, 103, 117, 130,131, 144, 158, 160 и 171. Колонка BP21, 50 м × 0,32 мм × 0,25 мкм Температура печи 60°C в течение 1 мин, затем запрограммированное повышение на 2°C/мин до 220°C. Температура инжектора: 250°C.
1. глиоксаль; 2. метилглиоксаль; 3. диацетил; 4. 2,3-пентандион; 5. 2,3-гександион (внутренний стандарт); 6. фенилглиоксаль (не исследовался данным методом).

Библиография

Bartowski E.J. and Henschke P.A. The buttery attribute of wine – diacetyl – desirability spoilage and beyond. Int. J. Food Microbiol. 96: 235-252 (2004).

Bednarski W., Jedrychowski L., Hammond E., and Nikolov L., A method for determination of D-dicarbonyl compounds. J. Dairy Sci. 72:2474-2477 (1989).

Leppannen O., Ronkainen P., Koivisto T. and Denslow J. A semiautomatic method for the gas chromatographic determination of vicinal diketones in alcoholic beverages. J. Inst. Brew. 85:278- 281 (1979).

Martineau B., Acree T. and Henick-Kling T., Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. Food Res. Int. 28:139-143 (1995).

Moree-Testa P. and Saint-Jalm Y., Determination of D-dicarbonyl compounds in cigarette smoke. J. Chromatogr. 217:197-208 (1981).

De Revel G., Pripis-Nicolau L., Barbe J.-C. and Bertrand A., The detection of α-dicarbonyl compounds in wine by the formation of quinoxaline derivatives. J. Sci. Food Agric. 80:102-108 (2000).

De Revel G. and Bertrand A. Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes. Proc 7th Weurman Flavour Research Symp., Zeist, June, pp 353-361 (1994).

De Revel G. and Bertrand A., A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. J. Sci. Food Agric. 61:267-272 (1993).

Voulgaropoulos A., Soilis T. and Andricopoulos N., Fluorimetric determination of diacetyl in wines after condensation with 3,4-diaminoanisole. Am. J. Enol. Vitic. 42:73-75 (1991).

Gilles de Revel et Alain Bertrand, Analyse des composés α-dicarbonyles du vin après dérivation par le 1-2-diaminobenzène OIV FV 1275

Определение содержания карбоксиметилцеллюлозы (целлюлозной камеди, КМЦ) в белых винах
(OIV-Oeno 404-2010)

OIV-MA-AS315-22 Метод IV типа

1. Введение

Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) — это полимер, полученный из натуральной целлюлозы, который уже много лет регулярно используется в качестве пищевой добавки (INS 466) в таких продуктах как мороженое и полуфабрикаты [1] для придания им мягкости. Использование КМЦ в белых и игристых винах для стабилизации солей винной кслоты [2] было недавно одобрено МОВВ в резолюции Oeno 2/2008 при условии, что доза, добавляемая в вино, составляет менее 100 мг/л. Поэтому был разработан специальный метод определения КМЦ в белом вине на основе метода Х.Д. Грэхэма (H.D Graham), опубликованного в 1971 году [3].

2. Область применения

Метод применяется к белым винам (негазированным и игристым).

3. Сущность метода

После выделения КМЦ из вина путем диализа его гидролизуют в кислой среде с образованием гликолевой кислоты, которая затем распадается с образованием формальдегида. 2,7-Дигидроксинафталин (ДГН) добавляют для образования 2,2,7,7-тетрагидроксидинафтилметана в присутствии формальдегида. Образовавшийся комплекс приобретает пурпурно-синий цвет под действием концентрированной серной кислоты при 100 °C, что позволяет проводить колориметрическое измерение при 540 нм (рис. 1).

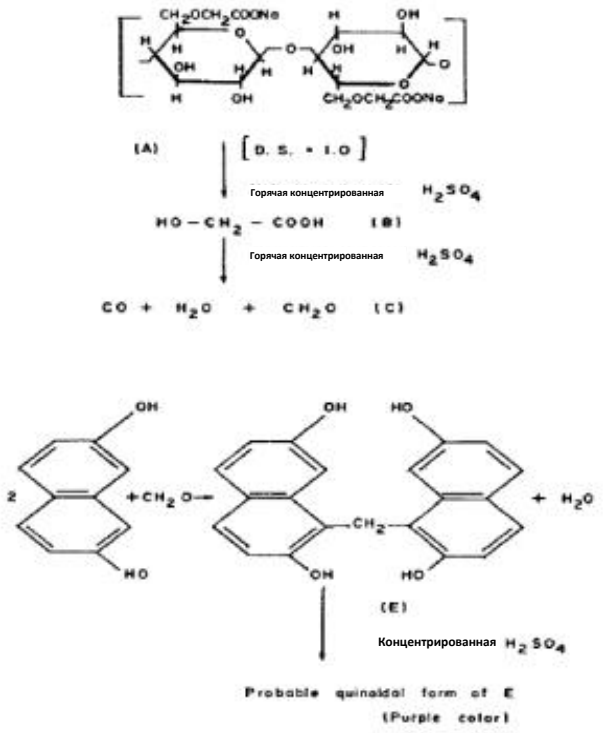


Рисунок 1: Механизм реакции КМЦ с ДХН в горячей концентрированной серной кислоте
(Фейгль, 1966)

4. Реактивы

- Карбоксиметилцеллюлоза натрия [N° CAS 9004-32-4] (21902 - средняя вязкость 400-1000 мПа/с, степень замещения 0,60-0,95)
- 2,7-дигидроксинафталин [N° CAS 582-17-2] (чистота> 98,0 % - ВЭЖХ)
- 95 % концентрированная серная кислота
- Очищенная вода для использования в лаборатории (образец качества: EN ISO 3696)

5. Оборудование

- Лабораторная стеклянная тара
- Диализная мембрана (6000-8000 Da)
- Ванна с регулируемой температурой
- Двухлучевой спектрофотометр УФ и видимой областей спектра

6. Проведение исследования

6.1 Подготовка реагента
- Помещают 50 мг ДХН, взвешенных с точностью до 1 мг, в градуированную колбу объемом 100 мл.
- Добавляют концентрированную серную кислоту до линии метки.
- Помещают градуированную колбу на термостатируемую баню при температуре 28 °C на 4 часа. (без перемешивания).
- После нагревания переливают реагент в колбу из темного стекла и хранят в холодильнике при 4 °C.

6.2 Подготовка образцов для проведения анализа вина
- Помещают 20 мл вина после дегазации в диализную мембрану.
- Помещают диализную мембрану с вином в 6-литровую колбу, наполненную дистиллированной водой.
- Оставляют для диализа на 24 часа, дважды меняя воду.

6.3 Цветная реакция
- Помещают 1 мл диализированного вина в пробирку.
- Добавляют 9 мл реагента.
- Помещают пробирку на термостатируемую баню при 100 °C на 2 часа.
- Анализируют окрашенный раствор с помощью УФ-видимого спектрофотометра при 540 нм и измеряют значение абсорбции.

6.4 Расчет содержания КМЦ в вине
- Наносят значение поглощения, полученное в пункте 6.3, на калибровочную кривую, полученную для вина (см. рисунок 2).

7. Характеристика метода

Были определены элементы внутренней валидации, но они не соотносятся с результатами официальной валидации в соответствии с протоколом, регулирующим планирование, проведение и интерпретацию исследований эффективности методов анализа (OIV 6/2000).

7.1 Линейность реакции

В белое вино добавляли нарастающие порции КМЦ в диапазоне от 0 и 100 мг/л, затем подвергли диализу и обработали в условиях, определенных в процедуре, описанной выше. Отклик носит линейный характер для рассматриваемых концентраций (рисунок 2).

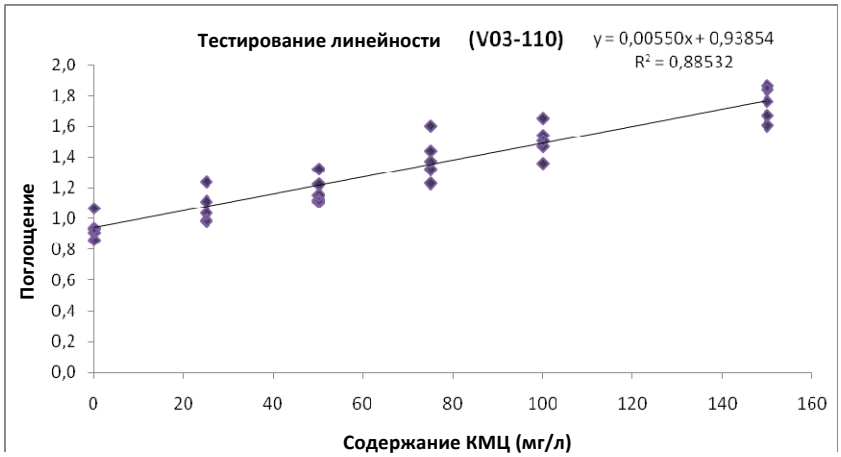


Рисунок 2: Линейность определения КМЦ в белом вине

7.2 Повторяемость

Повторяемость определения КМЦ в белых винах была определена на основе результатов, полученных на 22 образцах вина, которые подвергались двум последовательным анализам, таким образом, чтобы анализ проводился в идентичных условиях. Результаты приведены в таблице

	рассчитанные значения
Повторяемость:	
стандартное отклонение	0,075
CV в %	7,2 %
r-лимит	0,21
r-предел в %	**20 %**

Таблица 1: Повторяемость результатов определения КМЦ в белом вине

7.3 Повторяемость

Воспроизводимость результатов определения КМЦ в белых винах была определена путем анализа белого вина на КМЦ в 12 повторах в разные даты. Результаты приведены в таблице 2.

	рассчитанные значения
Воспрозводимость:	
стандартное отклонение	0,082
CV в %	9,6 %
R-лимит	0,23
R-предел в %	**27 %**

Таблица 1: Воспроизводимость результатов определения КМЦ в белом вине

7.4 Специфика

Специфика определения КМЦ была проверена путем добавления определенных количеств КМЦ в белые вина. Коэффициенты восстановления, измеренные таким образом, приведены в таблице 3.

Образец	Добавленная концентрация (мг/л)	Полученная концентрация (мг/л)	тепень восстановления
Вино 1	5	33	66 %
Вино 1	5	51	102 %
Вино 1	5	24	77 %
Вино 2	7	78	104 %
Вино 2	7	90	121 %
Вино 2	7	69	92 %
Вино 3	100	109	109 %
Вино 3	100	97	97 %
Вино 3	100	103	103 %
Вино 4	150	163	109 %
Вино 4	150	149	100 %
Вино 4	150	159	106 %

Table 3: Специфика определения КМЦ в белом вине.

7.4 Пределы обнаружения и количественного определения
Пределы обнаружения (LD) и количественного определения (LQ) были рассчитаны для неочищенного вина, которое подверглось 10 анализам. Определенный таким образом предел обнаружения составляет 14 мг/л, а предел количественного анализа - 61 мг/л.
Таким образом, метод позволяет обнаружить добавление КМЦ в белое вино в количестве, превышающем 20 мг/л, и количественное определение, если оно превышает 60 мг/л; что является неудовлетворительным, но допустимо для максимальной разрешенной дозировки в 100 мг/л.

7.5 Погрешность
Погрешность была рассчитана при 3 различных уровнях концентрации (25, 75 и 150 мг/л) на основе результатов анализа вин, прошедших обработку КМЦ с использованием стандартного отклонения воспроизводимости.

Полученная таким образом погрешность составляет 40 мг/л, независимо от определения КМЦ.

8. Библиография

[1] Regulation (CE) N° 1333/2008 of the 16th of December, 2008 concerning food additives

[2] Stabilisation tartrique des vins par la carboxyméthylcellulose - Bulletin de

l'OIV 2001, vol 74, n°841-842, p151-159.

[3] Determination of carboxymethycellulose in food products - H.D Graham, Journal of food science 1971, p 1052-1055

OIV-MA-AS315-23 Тип метода: критерии

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНО АЛЛЕРГЕННЫХ ОСТАТКОВ БЕЛКОВЫХ ОКЛЕИВАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ВИНЕ (OIV-Oeno 427–2010, заменен на OIV-COMEX 502-2012)

1 Тип метода: критерии

Истинность — близость соответствия между средним значением, полученным из серии результатов испытаний, и принятым эталонным значением.

r = Предел повторяемости, значение, ниже которого абсолютная разница между двумя единичными результатами испытаний, полученными в условиях повторяемости (т.е. один и тот же образец, оператор, аппарат, лаборатория, короткий интервал времени), может находиться в пределах определенной вероятности (обычно 95%), следовательно $r = 2.8 \times s_r$.

S_r = Стандартное отклонение, рассчитанное по результатам, полученным в условиях повторяемости

RSD_r Относительное стандартное отклонение, рассчитанное по результатам, полученным в условиях повторяемости $[(S_r/x) \times 100]$, где x - среднее значение результатов по всем лабораториям и образцам.

R = Предел воспроизводимости, значение, ниже которого абсолютная разница между отдельными результатами испытаний, полученными в условиях воспроизводимости (т.е. на идентичнома материале, полученном операторами в разных лабораториях с

использованием стандартного метода анализа), может находиться в пределах определенной вероятности (обычно 95%); $R = 2.8 \times S_R$.

S_R = Стандартное отклонение, рассчитанное по результатам в условиях воспроизводимости.

RSD_R = Относительное стандартное отклонение, рассчитанное по результатам, полученным в условиях воспроизводимости $[(S_R/x) \times 100]$.

Ho_R = Значение HORRAT: наблюдаемое значение RSDR, деленное на значение RSDR, рассчитанное по уравнению Горвица (Horwitz).

B_0 = Значение холостого хода

LOD = Предел обнаружения, рассчитывается как LOD = B3* S_r (B_o)

LOQ = Предел количественного определения, рассчитывается как LOD = B_O+10*Sr(B_O)

2. Общие аспекты

Требования
Метод анализа должен быть связан с конкретной энологической практикой.

Добавки или вспомогательные средства обработки, содержащие аллергенные белки
Каждый продукт должен быть охарактеризован по химическим показателям. Требуется строгий контроль качества.

Класс аналитических методов
В целом методы ИФА считаются наиболее подходящими и простыми для регулярного контроля содержания аллергенов.

Для определения аллергенных остатков белковых оклеивающих веществ в вине можно использовать методы иммуноферментного анализа «сэндвич» типа («сэндвич»-ИФА), конкурентые, прямые или непрямые. При отсутствии антител, меченных ферментом, для определения можно использовать биотинилированные антитела и конъюгат авидин-HRP.

Антитела

- Характеристика антител (оценка обнаружения аллергенов с более высокой или низкой степенью родства)
- Высокая специфичность для коммерческих средств обработки (описанных выше)
- Характеристика перекрёстной специфичности с учетом белков, обычно включаемых в энологическую практику
- Способность обнаруживать производные аллергена, которые могут образоваться в результате энологической обработки (протеолиз или модифицированные молекулы).

Метод

- Антитела должны обладать оптимальными параметрами связывания в образцах вина
- Методы должны быть оптимальны для образцов вина, имеющего различные химические характеристики (pH и сухой экстракт, красное и белое вино и т.д.)
- Результаты для вин из разных географических зон (даже при применении различных энологических методов) должны быть сопоставимыми
- Связывающие параметры антител должны быть оптимальными при различных условиях созревания вина (время, температура, изменение цвета).

3. Тип методов

Конкретные методы определения белков в вине пока не разработаны. Несколько методов ИФА уже доступны и могут применяться.

Лаборатории могут использовать метод, утвержденный в соответствии с требованиями МОВВ и отвечающий критериям эффективности, указанным в Таблице 1. Там, где это возможно, валидация должна включать сертифицированный эталонный материал в составе совместных пробных тестов. Если такой материал недоступен, следует использовать

альтернативную оценку достоверности.

Общий регламент для прямого и непрямого метода ИФА

В прямом одноэтапном методе используется только одно меченое антитело. Это меченое антитело инкубируется с антигеном, содержащимся в образце/стандарте, и связывается с лункой.

В непрямом двухэтапном методе для обнаружения используется вторичное меченое антитело. Сначала первичное антитело инкубируется с антигеном, содержащимся в образце/стандарте, и связывается с лункой. Затем следует инкубация с меченым вторичным антителом, которое распознает первичное антитело.

Прямой

1. Подготавливают поверхность, с которой связан антиген в образце.
2. Блокируют любые неспецифические участки связывания на поверхности.
3. Наносят антитела, меченные ферментом, которые специфически связываются с антигеном.
4. Промывают пластину, чтобы удалить избыток конъюгатов антитела и фермента.
5. Наносят химическое вещество, которое преобразуется ферментом в цветной, флуоресцентный или электрохимический сигнал.
6. Измеряют абсорбцию, флуоресценцию или электрохимический сигнал (например, ток) в лунках планшета для определения наличия и количества антигена.

Перед проведением анализа препараты антител должны быть очищены и конъюгированы

Непрямой

1. Подготавливают поверхность, с которой связывается антиген в образце.
2. Блокируют любые неспецифические участки связывания на поверхности.
3. Наносят первичные антитела, которые специфически связываются с антигеном.
4. Промывают пластину, чтобы избытки первичных антител (несвязанные) были удалены.
5. Наносят вторичные антитела, связывающиеся с ферментом, которые специфичны по отношению к первичным антителам.
6. Промывают пластину, чтобы удалить избыток конъюгатов антитело-фермент.

7. Наносят химическое вещество, которое преобразуется ферментом в цветной, флуоресцентный или электрохимический сигнал.
8. Измеряют абсорбцию, флуоресценцию или электрохимический сигнал (например, ток) в лунках планшета, чтобы определить наличие и количество антигена.

Перед проведением анализа оба препарата антител должны быть очищены, и один из них должен быть конъюгирован.

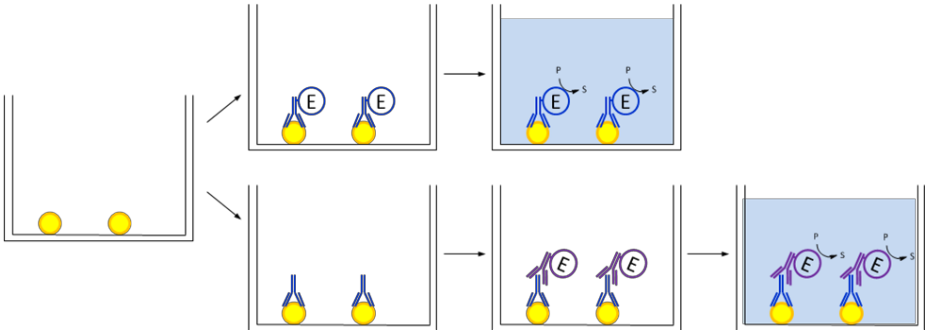


Рисунок 1: Прямой и непрямой методы ИФА

Для большинства исследований лучше всего подходит титрационный планшет из полистирола с высокой степенью связывания; однако для определения наиболее подходящего типа планшета для связывания данного антигена следует обратиться к рекомендациям производителя.

Основным преимуществом прямого и непрямого методов ИФА является высокая чувствительность, достигаемая за счет сравнительно простой настройки при снижении вероятности неспецифического связывания. Однако этот метод применим только в образцах, содержащих небольшое количество белка, не являющегося антигеном.

Общий регламент метода типа («сэндвич»-ИФА

Термин "конкурентный" описывает анализы, в которых измерение включает количественное определение вещества по его способности вмешиваться в установленную систему. Обнаружение может осуществляться непосредственно, одноэтапным методом, или косвенно, двухэтапным методом.

Прямой

1. Подготавливают поверхность, с которой связано определенное количество антигена.
2. Блокируют любые неспецифические участки связывания на поверхности.
3. Наносят образец или стандарт (антиген) и фермент-связывающие антитела, которые специфически связываются с антигеном, на микропланшет. Антигены, иммобилизованные на поверхности, и антигены в растворе "конкурируют" за антитела. Следовательно, чем больше антигена в образце, тем меньше антител будет связано с иммобилизованными антигенами.
4. Промывают пластину, чтобы удалить избыток антител (несвязанных) и несвязанные комплексы антиген-антитело.
5. Наносят химическое вещество, которое преобразуется ферментом в цветной, флуоресцентный или электрохимический сигнал.
6. Измеряют абсорбцию, флуоресценцию или электрохимический сигнал (например, ток) в лунках планшета, чтобы определить наличие и количество антигена.

Перед проведением анализа препараты антител должны быть очищены и конъюгированы.

Непрямой

1. Подготавливают поверхность, с которой связано определенное количество антигена.
2. Блокируют любые неспецифические области связывания на поверхности.
3. Наносят образец или стандарт (антиген) и специфическое первичное антитело на микропланшет. Антигены, иммобилизованные на поверхности, и антигены в растворе "конкурируют" за антитела. Следовательно, чем больше антигена в образце, тем меньше антител будет связано с иммобилизованными антигенами.
4. Промывают пластину, чтобы удалить избыток антител (несвязанных) и несвязанные комплексы антиген-антитело.
5. Добавляют вторичное антитело, специфичное к первичному антителу, конъюгированное с ферментом.
6. Промывают пластину так, чтобы конъюгированные антитела в избытке (несвязанные) были удалены
7. Наносят химическое вещество, которое преобразуется ферментом в цветной, флуоресцентный или электрохимический сигнал.

8. Измеряют абсорбцию или флуоресценцию или электрохимический сигнал (например, ток) в лунках планшета, чтобы определить наличие и количество антигена.

Перед проведением анализа оба препарата антител должны быть очищены, а один из них должен быть конъюгирован.

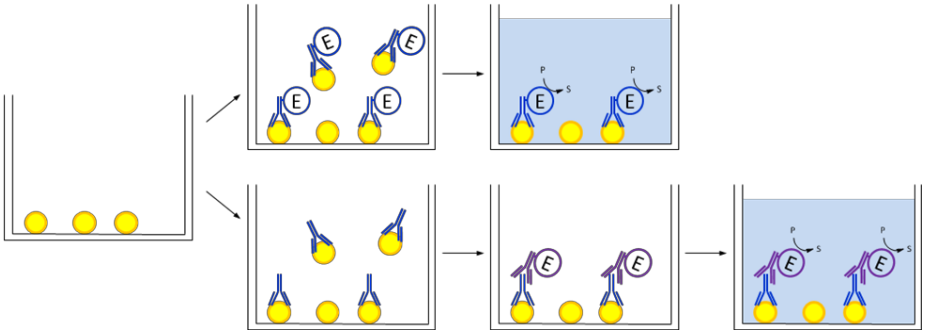


Рисунок 2: Прямой и непрямой конкурентный ИФА

В конкурентном методе ИФА, чем выше исходная концентрация антигена, тем слабее сигнал.

Для большинства применений лучше всего подходит микропланшет из полистирола с высокой степенью связывания, однако для определения наиболее подходящего типа планшета для связывания данного антигена следует обратиться к рекомендациям производителя.

Общий регламент для «Сэндвич» метода ИФА

«Сэндвич» метод ИФА измеряет количество антигена между двумя слоями антител (т.е. антителом захвата и антителом обнаружения). Измеряемый антиген должен содержать как минимум два разных антигенных участка (эпитопа) для связывания двух разных антител. Могут использоваться как моноклональные, так и поликлональные антитела.

Прямой

1. Подготавливают поверхность, к которой привязано антитело захвата.

2. Блокируют любые неспецифические участки связывания на поверхности.

3. Наносят антигенсодержащий образец или стандарт на пластину.

4. Промывают пластину, чтобы удалить несвязанный антиген.

5. Добавляют антитела, связывающиеся с ферментом (антитела для детекции), которые специфически связываются с антигеном.

6. Промывают пластину, чтобы удалить избыток энзимно-связанных антител(несвязанные).

7. Наносят химическое вещество, которое преобразуется ферментом в цветной, флуоресцентный или электрохимический сигнал.

8. Измеряют абсорбцию, флуоресценцию или электрохимический сигнал (например, ток) в лунках планшета для определения наличия и количества антигена.

Перед проведением анализа оба препарата антител должны быть очищены, а один - конъюгирован.

Непрямой

1. Подготавливают поверхность, к которой привязано антитело захвата.
2. Блокируют любые неспецифические участки связывания на поверхности.
3. Наносят антигенсодержащий образец или стандартный образец на пластину.
4. Промывают пластину, чтобы удалить несвязанный антиген.
5. Наносят первичные антитела, которые специфически связываются с антигеном.
6. Промывают пластину, чтобы удалить избыточное (несвязанное) первичное антитело.
7. Наносят энзим-связанные антитела (вторичные антитела), которые специфически связываются с первичным антителом.
8. Промывают пластину, чтобы удалить избыток (несвязанных) ферментных антител.
9. Наносят химическое вещество, которое преобразуется ферментом в цветной, флуоресцентный или электрохимический сигнал.
10. Измеряют абсорбцию, флуоресценцию или электрохимический сигнал (например, ток) в лунках планшета, чтобы определить наличие и количество антигена.

Перед проведением анализа все препараты антител должны быть очищены, а один из них один из них должен быть конъюгирован.

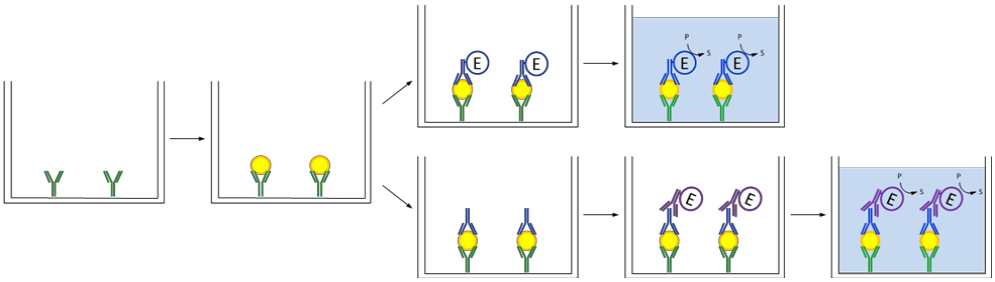


Рисунок 3: Прямой и непрямой методы «Сэндвич»-ИФА

Для непрямого метода «Сэндвич»-ИФА необходимо, чтобы антитела захвата и антитела обнаружения были выращены в разных видах (например, в организме мыши и кролика), чтобы фермент-связывающие вторичные антитела, специфичные для антител обнаружения, не связывались также с антителами захвата.

В большинстве случаев лучше всего подходит микропланшет из полистирола с высокой степенью связывания; однако для определения наиболее подходящего типа планшета для связывания данного антигена обратитесь к рекомендациям производителя.

В методе «Сэндвич»-ИФА измерение пропорционально количеству антигена в образцах.

Преимущество метод сэндвич-ИФА заключается в том, что даже неочищенные образцы не нужно очищать перед анализом, и анализ может быть очень чувствительным.

Таблица 1: Критерии эффективности методов анализа на наличие потенциально аллергенных остатков белковых оклеивающих веществ в вине

Параметр	**Значение параметра/Комментарий**
Применимость	Применим для определения аллергенных остатков белковых оклеивающих веществ в вине для использования в промышленных целях. Предел обнаружения (выражается в мг/л)
Предел обнаружения	(выраженный в мг/л) ≤ 0,25
Предел количественного определения	(выраженный в мг/л) ≤ 0,5
Характеристики точности метода	Значения HORRAT меньше или равные 2 в рамках совместного испытания в рамках валидации процесса
Восстановление	80% - 105% (как указано в совместном испытании)
Специфика	Отсутствие матричных помех

Систематическая погрешность	$\left\|\overline{x} - m\right\| < 1{,}96 * \sqrt{s_{R(lab)^2} - s_{r(lab)^2} * \left(1 - 1/n\right)}$ где m сертифицированное значение эталонного материала вина, а x - среднее значение из n измерений содержания соединений в данном вине в одной и той же лаборатории. $S_{r(lab)}$ стандартные отклонения, рассчитанные по результатам измерений в одной лаборатории в условиях воспроизводимости. $S_{R(lab)}$ стандартные отклонения, рассчитанные по результатам, полученным в разных лабораториях в условиях воспроизводимости.

Метод OIV-MA-AS315-24 Метод IV типа

Определение содержания лизоцима в вине с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза

(Пересмотрено Oeno 385/2012)

1. Введение

Этот метод используется для обнаружения добавления лизоцима в вино, но не подходит для анализа или оценки лизоцима как аллергенного соединения.

Определение остаточного лизоцима в обработанных винах проводится с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭ).

2. Область применения

Данный метод применяется для определения лизоцима в белых винах при концентрации от 9 мг/л до 100 мг/л, а также путем разбавления выше данного уровня.

3. Сущность метода

Образцы вина непосредственно вводятся в прибор для капиллярного электрофореза после фильтрации и разбавления, по мере необходимости. Количественное определение лизоцима проводится по внешнему стандарту.

4. Реактивы

Экстракт лизоцима из белка куриного яйца [CAS № 12650-88-3]
85% Фосфорная кислота [CAS № 7664-38-2]
Гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) [CAS № 9004-65-3]
Очищенная вода для лабораторного использования, например, по стандарту EN ISO 3696 (вода для аналитических лабораторий - спецификация и методы испытаний [ISO 3696:1987])

5. Аппаратура

Стандартное лабораторное оборудование

Прибор для капиллярного электрофореза с УФ-спектрофотометрическим детектором

6. Подготовка проб

Для анализа методом капиллярного электрофореза анализируемое вино разбавляется в четыре раза дистиллированной водой, чтобы уложиться в линейный динамический диапазон метода (содержание лизоцима менее 100 мг/л).

7. Аналитические условия

Капилляр: плавленый кварц (длина 37 см, диаметр 75 мкм)
Буфер: фосфорная кислота (75 мм) ГПМЦ (0,1 %), pH 1,68
Время впрыскивания: 15 сек
Режим впрыска: гидростатическая процедура (3447,38 Па) Температура: 25°C
Приложенное напряжение: 7 кВ
Детекция: УФ 214 нм

8. Расчеты

Калибровочная кривая строится на основе растворов лизоцима в воде с концентрацией 10, 20, 50 и 100 мг/л. В зависимости от метода внешней калибровки количественное определение лизоцима проводится путем измерения площади пика лизоцима в вине и сравнения ее с соответствующей концентрацией на калибровочной кривой.

9. Характеристики метода

9.1 Линейность отклика

Поскольку максимальная разрешенная доза лизоцима, которую можно добавлять в вина, составляет 500 мг/л, был подготовлен стандартный диапазон, содержащий от 5 до 500 мг/л лизоцима в водном растворе. Каждый раствор был проанализирован пять раз.

При концентрации выше 100 мг/л реакция перестает быть линейной. Линейный динамический диапазон метода составляет от 5 до 100 мг/л, как показано на калибровочной кривой на рисунке 1.

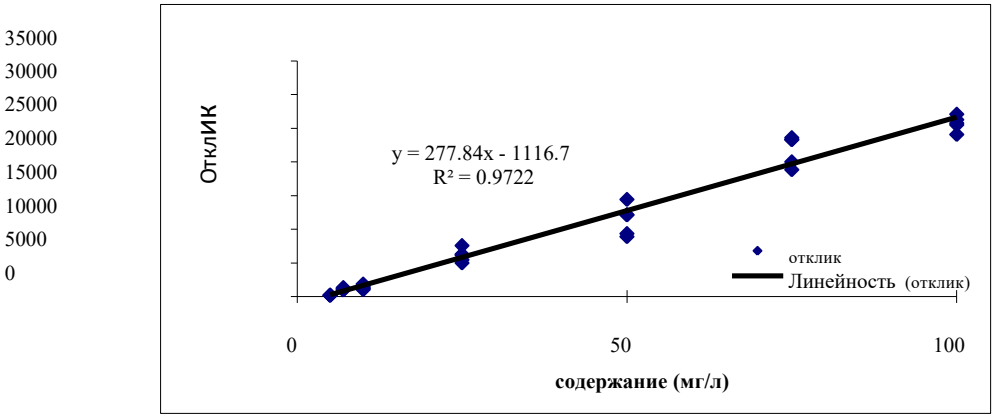


Рисунок 1: Линейность определения лизоцима с помощью ВЭХЭ

9.2 Повторяемость

Повторяемость определения лизоцима в белых винах была определена на основании результатов, полученных на 20 винах с добавлением лизоцима, проанализированных два раза подряд, для проведения испытаний в идентичных условиях. Результаты приведены в таблице 1:

Таблица 1: Повторяемость определения лизоцима с помощью метода ВЭКЭ

	Рассчитанные значения
Повторяемость	
стандартное отклонение в мг/л CV % предел r в мг/л r предел %	**2.63** **1.4%** **7.35** **4%**

9.3 Воспроизводимость

Воспроизводимость определения лизоцима в белых винах была определена путем анализа одного и того же белого вина с добавлением 200 мг/л лизоцима 8 раз в разные дни. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Воспроизводимость определения лизоцима с помощью ВЭКЭ

Воспроизводимость	Рассчитанные значения
стандартное отклонение в мг/л CV % предел R в мг/л R предел %	**11.75** **5.8%** **32.90** **16%**

9.4 Пределы обнаружения и количественного определения

Пределы обнаружения (LoD) и количественного определения (LoQ) устанавливаются на основе фонового шума, измеренного вблизи пика

лизоцима, соответствующего первой точке калибровки, т.е. 5 мг/л. Получены следующие результаты:
LoD = 3 X фоновый шум (мг/л.) = 3 мг/л.
LoQ = 10 X фоновый шум (мг/л.) = 9 мг/л.

9.5 Погрешность измерения

Погрешность была определена с использованием стандартного отклонения внутрилабораторной воспроизводимости, которое составляет 12 %.

10. Библиография

S. Chauvet, C. Lagrèze, A. Domec, M-H Salagoïty, B. Médina: Dosage du lysozyme dans le vin par électrophorèse capillaire haute performance OIV FV 1274

ME. Barbeito, C. Coria, C. Chiconofri : Influencia del filtrado de vinos para la determinación de lisozima según oeno 8/2007 OIV FV1306

Метод OIV-MA-AS315-25 Метод IV типа

Определение лизоцима в вине с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

(Резолюция OIV-OENO 458/2014)

1. Введение

Данный метод описывает аналитическую процедуру, используемую для определения лизоцима в красных и белых винах. Определение может быть проведено непосредственно на образце для белых вин, но для красных вин необходимо провести диссоциацию фермента от полифенольных макромолекул с помощью быстрого подщелачивания, с учетом амфотерного свойства белка.

2. Область применения

Данный метод позволяет количественно определить содержание лизоцима (мг протеина L^{-1}) в красных и белых винах независимо от активности фермента. Следует уточнить, что данный метод позволяет обнаружить лизоцим, добавленный в вино, но предел обнаружения метода не исключает какой-либо аллергенности, связанной с присутствием низких уровней лизоцима.

3. Сущность метода

Анализ проводится с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофлуориметрическим детектором. Неизвестное количество в образце вина рассчитывается по площади хроматографического пика с использованием метода внешнего стандарта.

4. Материалы и реактивы

4.1. Растворители и рабочие растворы
4.1.1. Ацетонитрил (CH_3CN), для ВЭЖХ (CAS № 75-05-8).
4.1.2. Трифторуксусная кислота (TFA) (CAS № 76-05-1)
4.1.3. Деионизированная вода, ВЭЖХ (CAS № 7732-18-5)
4.1.4. Стандарт лизоцима (CAS № 9001-63-2)
4.1.5. Винная кислота (CAS № 87-69-4)
4.1.6. Этанол (CAS № 64-17-5)

4.1.7. Нейтральный виннокислый калий (CAS № 921-53-9)
4.1.8. 28% гидроксид аммония (мас./мас.) (CAS № 1336-21-6)
4.1.9. 0,65 мкг целлюлозно-ацетатного фильтра

4.2 Стоковый раствор: 1 г/л$^{-1}$ винной кислоты в 10% этаноле (об./об.), отрегулированный до уровня pH 3,2 с помощью нейтрального виннокислого калия.

4.3 Элюенты
A: 1% CH3CN, 0.2% TFA, 98.8% H2O
B: 70% CH3CN, 0.2% TFA, 29.8% H2O

44.4 Эталонный раствор
Раствор, содержащий 250 мг/л$^{-1}$ стандарта лизоцима, растворяют в исходном растворе при непрерывном перемешивании в течение 1 часа. Хранится в холодильнике не более 4 недель.

4.5 Приготовление рабочих растворов
Для приготовления рабочих растворов эталонный раствор разбавляют исходным раствором до достижения желаемых концентраций. Эти растворы подготавливаются ежедневно.

5. Оборудование

5.1 Аппарат ВЭЖХ, оснащенный насосной системой, подходящей для градиентного элюирования
5.2 Термостатируемый отсек для колонок (печь)
5.3 Спектрофлуориметрический детектор
5.4 Петлевая инжекция 20 мкг
5.5 Обращенно-фазовая полимерная колонка с фенильными функциональными группами (пористость =1,000 Å, предел исключения = 1,000,000 Да), например, Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP, 4.6 мм ID ×7.5 см.
5.6 Предколонка из того же материала, что и колонка: Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel, 3,2 мм ID × 1,5 см, например.

6. Рабочие условия (на примере)

6.1 Скорость потока элюента: 1 мл/мин$^{-1}$
6.2 Температура элюирования: 40°C
6.3 Спектрофлуориметрический детектор: λ ex = 276 нм; λ em = 345 нм; усиление = 4

6.4 Среднее время удерживания лизоцима: 7,9 минут

Время (мин.)	**Подвижная фаза A (%)**	**Подвижная фаза B**
0	60	40
10.00	0	100
10.20	60	40
12.00	Контролер	Остановка

7. Подготовка пробы

7.1 Белые вина

Образцы белого вина фильтруют с использованием ацетатного фильтра из целлюлозы пористостью 0,65 мкг, а затем подвергают хроматографическому анализу. (При использовании нейлоновых фильтров с пористостью 0,45 мкг коэффициент извлечения ниже).

7.2 Красные вина

Образцы красного вина (50 мл) корректируются до pH 11,5. Образцы подщелачиваются с помощью NH_4OH (с учетом объема реагента для окончательного расчета) и затем сразу же фильтруются (через 5 мин) с использованием фильтров из ацетата целлюлозы с пористостью 0,65 мкг, которые вводятся в жидкий хроматограф (более низкий коэффициент восстановления при использовании нейлоновых фильтров с пористостью 0,45 мкг).

8. Подготовка контрольного образца

Раствор эталонного стандарта (4.4) добавляют к образцу и готовят его, как описано в пункте 7. Определяется процентное восстановление.

9. Выражение результатов

Для хроматографического профиля стандарта лизоцима для тестируемого аналита при указанных ниже хроматографических условиях наблюдалось адекватное разрешение (рис. 1 и рис. 4). Анализ образца без лизоцима позволил наблюдать профиль вина без обнаружения каких-либо помех при определении фермента (рис. 2 и рис. 5).

В белых винах было восстановлено более 95% фермента (рис. 3), а в красных винах при использовании этого метода наблюдалось восстановление фермента от 70 до 95%, в зависимости от концентрации полифенолов, присутствующих в образце вина (рис. 6). Результат выражается в миллиграммах на литр (мг/л$^{-1}$).

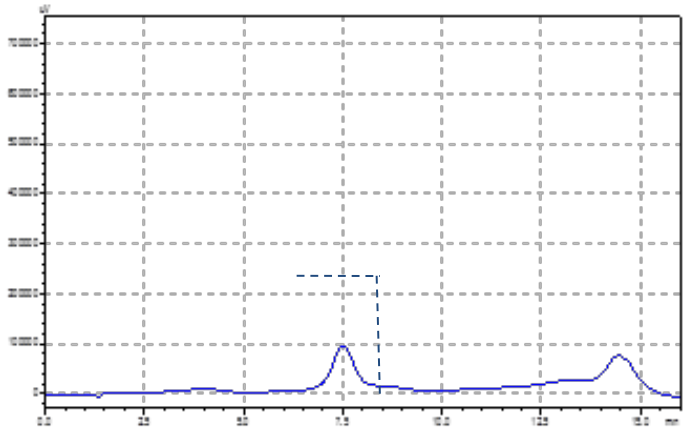


Рис. 1 Хроматограмма стандарта лизоцима 10 мг/л$^{-1}$

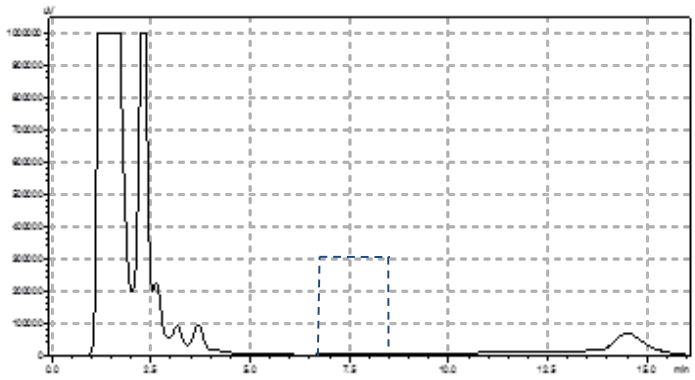


Рис. 2 Хроматограмма образца белого вина без лизоцима

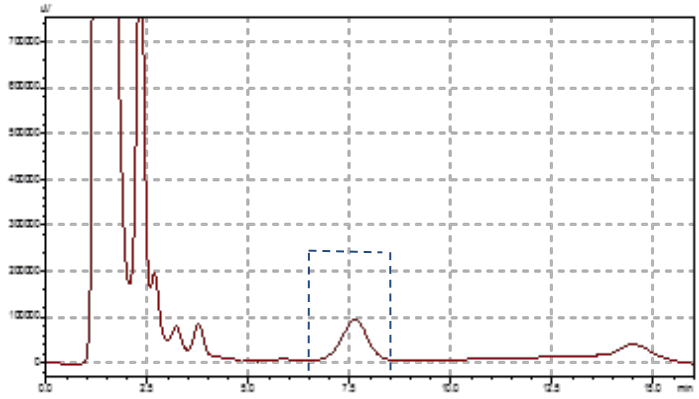


Рис. 3 Хроматограмма образца белого вина с 10 мг/л$^{-1}$ лизоцима

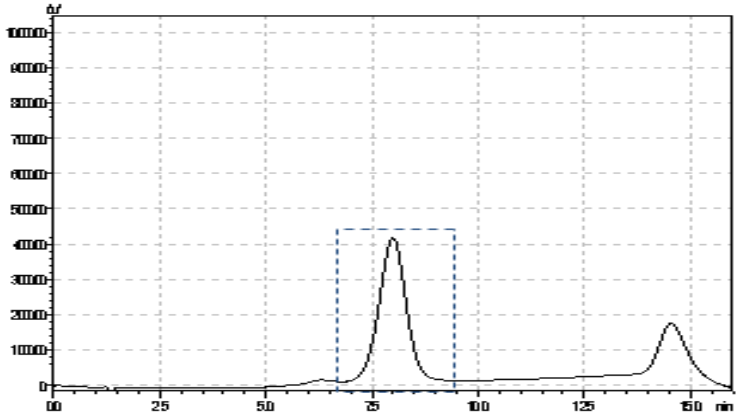


Рис. 4 Хроматограмма стандарта лизоцима 50 мг/л$^{-1}$

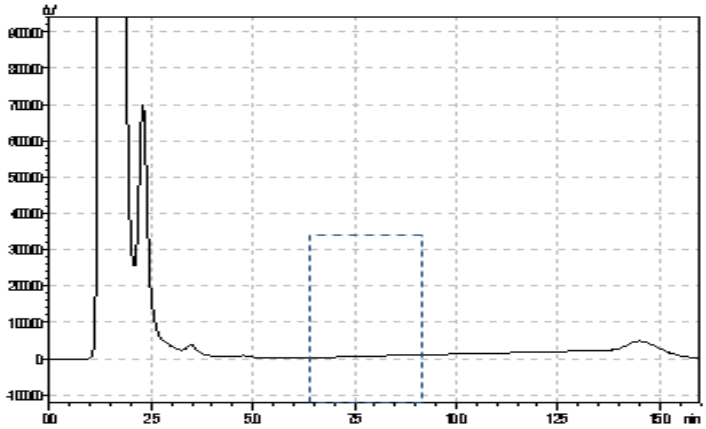


Рис. 5 Хроматограмма образца красного вина без лизоцима

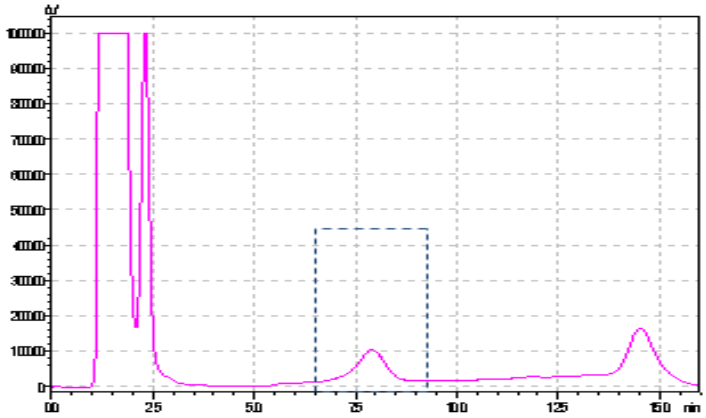


Рис. 6 Хроматограмма образца красного вина с 50 мг/л$^{-1}$ лизоцима.

10. Аналитическая процедура для белых вин

10.1. Параметры внутренней валидации

10.1.1. Повторяемость

Повторяемость метода была изучена для интервала между 2 мг/л$^{-1}$ и 25 мг/л$^{-1}$ в белом вине. 17 образцов белого вина, обогащенных различными концентрациями лизоцима, были проанализированы в двух экземплярах.

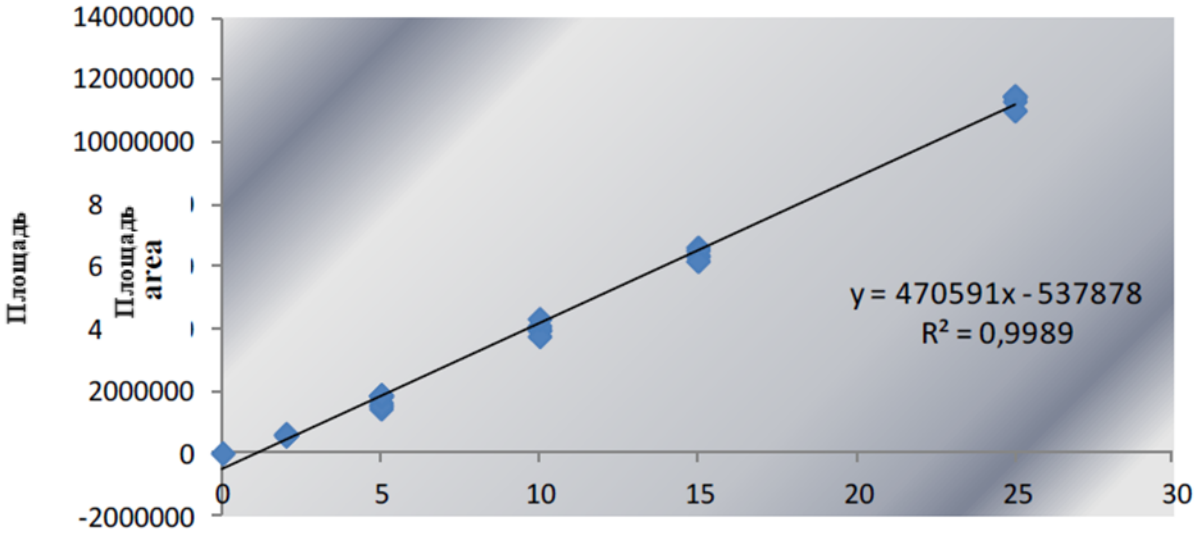
Результаты повторяемости, полученные при уровне вероятности 95%, были следующими:

Концентрация измеряется в мг/л $^{-1}$	**Sr мг/л $^{-1}$**	**r (2.8xSr) мг/л $^{-1}$**
2	0.25	0.7
5	0.30	0.82
10	0.42	1.1
15	0.61	1.7
25	0.40	1.12

Средний предел повторяемости (r) составляет 1,2 мг/л$^{-1}$

10.1.2. Линейность

Для расчета линейности было проведено 30 измерений площади пика 6 различных концентраций лизоцима в белом вине, а именно: аналитическая слепая проба без лизоцима, концентрации 2 мг/л$^{-1}$, 5 мг/л$^{-1}$, 10 мг/л$^{-1}$, 15 мг/л$^{-1}$и 25 мг/л$^{-1}$. На основании этих измерений были рассчитаны у-пересечение, градиент и коэффициент корреляции.



Концентрация лизоцима (мг/л)

Рис. 7 Динамический диапазон определения лизоцима в белых винах до 25 мг/л$^{-1}$

10.1.3. Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения, полученный для данного метода, был рассчитан с помощью графической процедуры, полученной на основе фонового шума записи.

Были получены следующие значения:

LOD: 0.49 мг/л$^{-1}$

LOQ: 1.62 мг/л$^{-1}$

10.1.4. Внутрилабораторная воспроизводимость

Внутрилабораторная воспроизводимость метода была изучена для интервала между 2 мг/л$^{-1}$и 25 мг/л$^{-1}$ в образце белого вина в течение 30-дневного периода. Следует отметить, что в связи с нестабильностью анализируемого вещества, образец вина был пролит эталонным раствором лизоцима (4.4) в тот же день, когда проводился анализ. Было проведено 16 измерений через равные промежутки времени.

Были получены следующие результаты:

Концентрация измеряется в мг/л $^{-1}$	**SR мг/л $^{-1}$**	**R (2.8xSR) мг/л $^{-1}$**
2	0.19	0.53
5	0.36	1.0
10	0.48	1.3
15	0.64	1.8
25	0.93	2.6

Средний предел воспроизводимости (r) составляет 1,45 мг/л$^{-1}$

11. Процедура анализа красных вин

11.1 Внутренние параметры валидации

11.1.1. Повторяемость

Повторяемость метода была изучена для интервала между 5 мг/л$^{-1}$ и 25 мг/л$^{-1}$ в красном вине. 21 образец красного вина, обогащенного различными концентрациями лизоцима, был проанализирован в двух экземплярах.
Результаты повторяемости, полученные при уровне вероятности 95%, были следующими:

Концентрация измеряется в мг/л $^{-1}$	**Sr мг/л $^{-1}$**	**r (2.8xSr) мг/л $^{-1}$**
5	0.38	1.06
10	0.64	1.79
15	0.59	1.65
25	0.30	0.8

Средний предел повторяемости (r) составляет 1,4 мг/л$^{-1}$

11.1.2. Линейность

Для расчета линейности было проведено 25 измерений площади пика 5 различных концентраций лизоцима в красном вине, а именно: аналитическая слепая проба без лизоцима, концентрации 5 мг/л$^{-1}$, 10 мг/л$^{-1}$, 15 мг/л$^{-1}$и 25 мг/л$^{-1}$. Из этих измерений были рассчитаны у-пересечение, градиент и коэффициент корреляции.

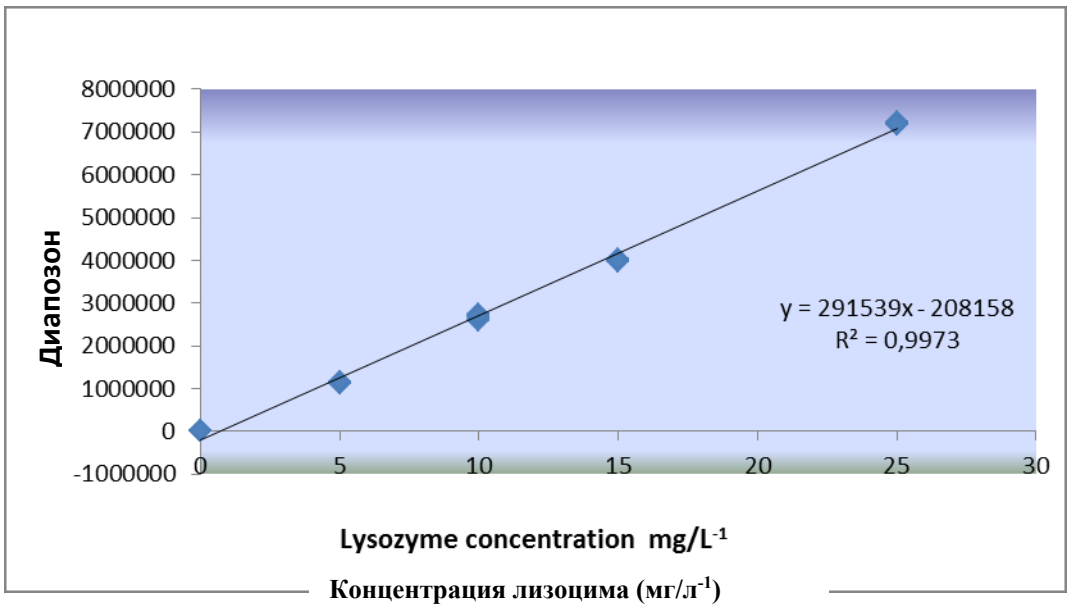


Рис. 8 Динамический диапазон определения лизоцима в белых винах до 25 мг/л$^{-1}$

11.1.3. Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения был рассчитан с помощью графической процедуры, полученной на основе фонового шума записи.

Были получены следующие значения:
LOD: 0.88 мг/л$^{-1}$
LOQ: 2.90 мг/л$^{-1}$

11.1.4. Внутрилабораторная воспроизводимость

Внутрилабораторная воспроизводимость метода была изучена для интервала между 5 мг/л$^{-1}$и 25 мг/л$^{-1}$ в образце красного вина в течение 30-дневного периода. Следует отметить, что в связи с нестабильностью анализируемого вещества, образец вина был дозирован эталонным раствором лизоцима (4.4) в тот же день, когда проводился анализ. Было проведено 16 измерений через равные промежутки времени.

Были получены следующие результаты:

Концентрация измеряется в мг/л -1	**Sr мг/л -1**	**r (2.8xSr) мг/л -1**
5	0.4	1.12
10	0.91	2.54
15	0.54	1.5
25	0.53	1.5

Средний предел воспроизводимости (r) составляет 1,7 мг/л$^{-1}$

12. Библиография

1. Резолюция OENO 8-2007 "Измерение лизоцима в вине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии" (2007).

2. Резолюция OENO 10-2005 "Практическое руководство по валидации, контролю качества и оценке неопределенности альтернативного метода энологического анализа".

Метод OIV-MA-AS315-26 Метод IV типа

Метод определения биогенных аминов в вине с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием на фотодиодной матрице

(Резолюция OIV-OENO 457/2014)

1. Область применения

Этот метод применим для анализа биогенных аминов в винах:

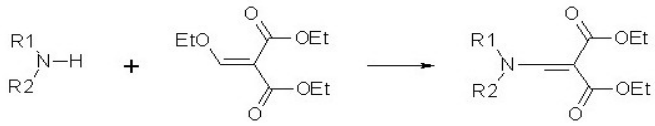
Амины	**Диапозон**
Гистамин	0.500 to 20 мг/л
Метиламин	0.250 to 20 мг/л
Этиламин	0.450 to 20 мг/л
Тирамин	0.235 to 20 мг/л
Путресцин	0.098 to 20 мг/л
Кадаверин	0.480 to 20 мг/л
Фенэтиламин (или Фенилэтиламин)	0.096 to 20 мг/л
Изоамиламин	0.020 to 20 мг/л

2. Определения

Слово "биогенный" означает "созданный жизнью". Поэтому термин "биогенные амины" относится ко всем аминам, образующимся в результате метаболизма живых, животных, растительных или микробных клеток. Биогенные амины в вине в основном имеют микробное происхождение. Основными из них являются гистамин, путресцин, кадаверин и тирамин.

3. Сущность метода

Биогенные амины, изучаемые здесь, являются первичными, вторичными, третичными, алифатическими или ароматическими аминами. Однако только ароматические амины поглощают ультрафиолет. Это связано с тем, что для обнаружения молекул с помощью УФ-излучения необходимо наличие хромофора в молекуле, обычно это последовательность сопряженных двойных связей.
Для того чтобы использовать ВЭЖХ/диодно-матричный детектор, необходимо присоединить хромофор к биогенным аминам. Для этого используется диэтил 2-(этоксиметилен)малонат (DEEMM), который путем алкилирования, также известного как дериватизация, позволяет получить биогенные амины, видимые детектором с диодной матрицей [1].



Реакция дериватизации

Примечание: Выход дериватизации рассчитывается путем добавления внутреннего стандарта (2,4,6-триметилфенэтиламина гидрохлорид или 2,4,6 триметилфенэтиламина гидрохлорид). Каждый из биогенных аминов определяется количественно по стандартному диапазону.

4. Реактивы и продукты

4.1 Список реактивов

Препараты сравнения:

	Продукт	CAS	Чистота
4.1.1	Гистамин	51-45-6	≥99%
4.1.2	Метиламин	74-89-5	≥99.5%
4.1.3	Этиламин	557-66-4	97%
4.1.4	Тирамин	60-19-5	≥98%
4.1.5	Путресцин (диаминобутан)	333-93-7	≥98%
4.1.6	Кадаверин (диаминопентан)	1476-39-	≥99%
4.1.7	Фенетиламин	64-04-0	≥99%
4.1.8	Изоамилами	107-85-7	99%
4.1.9	Борная	10043-	≥98.5%
4.1.10	Гидроксид натрия	1310-73-	≥98%
4.1.11	Азид натрия	26628-	≥99.5%
4.1.12	2,4,6-триметилфенэтиламин	3167-10-	97%
4.1.13	DEEM (диэтил 2-	87-13-8	97%
4.1.14	Ледяная уксусная кислота	64-19-7	≥99.7%
4.1.15	Метанол ВЭЖХ	67-56-1	≥99.9%
4.1.16	Ацетонитрил ВЭЖХ	75-05-8	≥99.93%
4.1.17	Соляная кислота	7646-01-	≥37%
4.1.18	Сверхчистая вода (18 МОм)		

5. Раствор внутреннего стандарта

Приготовление раствора 2 г/л:

Взвешивают 20 мг 2, 4, 6-триметилфенэтиламина гидрохлорида (4.1.12) Растворяют в 10 мл HCl 0,1M (5.1).

Хранение

Раствор хранится при комнатной температуре.

5.1 HCL 0.1 M раствор

Приготовление раствора HCL 0,1 M:

Отбирают примерно 900 мл сверхчистой воды (4.1.18), измерив с помощью градуированной мензурки (6.13)

Наливают приблизительно 500 мл сверхчистой воды (4.1.18) в волюметрическую колбу объемом 1 л (6.9)

Берут 100 мл образца HCl 1 M (приготовленного из промышленного продукта 4.1.17), измерив при помощи градуированного цилиндра (6.11)

Переливают 100 мл 1 M HCl (4.1.17) в волюметрическую колбу (6.9)

Доливают оставшуюся сверхчистую воду до 1 л.

Хранение

Раствор хранится при комнатной температуре.

5.2 Боратный буферный раствор (1M)

Для 100 мл раствора:

Взвешивают 6,183 г борной кислоты (4.1.9)

Растворяют в мензурке (6.2), добавив 80 мл сверхчистой воды (измеренной с помощью градуированной мензурки) (6.11)

Уровень pH корректируется до 9 с помощью 4N раствора NaOH (приготовленного из промышленного продукта 4.1.10).

Доводят объем до 100 мл в волюметрической колбе (6.7)

Примечание: для получения оптиимального растворения кристаллы борной кислоты должны растворяться при как можно более низком уровне pH. Для этого необходимо добавлять NaOH небольшими дозами (по 10 капель из пипетки Пастера) (6.30) в течение 3 часов.

Хранение

Раствор хранится при комнатной температуре.

5.3 Подвижная фаза ВЭЖХ

Подвижная фаза A: 25 мМ ацетатный буфер + 0,02% азида натрия pH 5,8:

Набирают пробу сверхчистой воды объемом 1,8 л в мензурку емкостью 2 л (6.3).
Добавляют 2,86 мл ледяной уксусной кислоты (4.1.14) (тщательно промывают наконечник в мензурке), затем добавляют 0,4 г азида натрия (4.1.11).
Перемешивают с помощью магнитной мешалки (6.24)
Уровень pH регулируется до 5,80 добавлением 4M NaOH с помощью пипетки Пастера (6.30) (около 6,5 мл).
Доводят объем до 2000 мл в волюметрической колбе емкостью 2000 мл (6.10)

Подвижная фаза B: ацетонитрил/метанол (80/20):

Для 2 л в подвижной фазы
Отбирают 400 мл образца метанола (4.1.15) с помощью градуированной мензурки (6.12), переливают его в тару с крышкой объемом 2 л (6.20) и добавляют в ту же емкость 1600 мл образца ацетонитрила (4.1.16), измеренного с помощью градуированного цилиндра (6.14).

Хранение

Растворы хранятся при комнатной температуре.

5.4 Стандартный диапазон биогенных аминов

Приготовление растворов A:

Исходный раствор A в концентрации 500 мг/л

Взвешивают около 50 мг (точный вес) гистамина (4.1.1), метиламина (4.1.2), этиламина (4.1.3), тирамина (4.1.4) и путресцина (4.1.5) и растворяют их в той же колбе емкостью 100 мл (6.7) с 0,1 M HCl (5.1).

Суррогатный раствор A при концентрации 50 мг/л

Берут 25 мл образца раствора A при концентрации 500 мг/л и переливают в колбу емкостью 250 мл (6.8). Доливают до 250 мл HCl 0,1 M (5.1).

Суррогатный раствор A при 40 мг/л

Берут 50 мл образца HCl 0,1 M (5,1) и переливают в колбу емкостью 250 мл (6,8). Доливают до 250 мл суррогатным раствором A в концентрации 50 мг/л.

Приготовление растворов B

Стоковый раствор B в концентрации 500 мг/л

Взвешивают около 50 мг (точно известный вес) кадаверина (4.1.6), фенэтиламина (4.1.7) и изоамиламина (4.1.8) и растворяют их в одной и той же колбе емкостью 100 мл (6.7) с 0,1 M HCl (5.1)

Суррогатный раствор B в концентрации 50 мг/л

Отбирают 25 мл образца раствора B до концентрации 500 мг/л и переливают в колбу емкостью 250 мл (6,8). Доливают до 250 мл 0,1 M HCl (5,1)

Суррогатный раствор B в концентрации 10 мг/л

Отбирают 50 мл образца суррогатного раствора B в концентрации 50 мг/л и переливают в колбу емкостью 250 мл (6,8)
Доливают до 250 мл 0,1 M HCl (5,1)

Соединение растворов A и B - Стандартный диапазон

В колбу емкостью 100 мл (6.7) добавляют 50 мл раствора A в концентрации 40 мг/л, при помощи волюметрической колбы емкостью 50 мл (6.6)

Доливают до 100 мл раствор B в концентрации 10 мг/л: в результате получится раствор с концентрацией 20 (A) / 5 (B) мг/л.

В следующей таблице описано, как определить точки концентрации на калибровочном графике:

Концентрация исходного раствора	Объем отобранной пробы исходного раствора	Корректировка до 100 мл с помощью 0,1 M	Концентрация конечного раствора
20(A) / 5 (B)	50	50	10 (A) / 2.5 (B)
10(A) / 2.5 (B)	50	50	5 (A) / 1.25 (B)
5(A) / 1.25 (B)	20	80	1 (A) / 0.25 (B)

Таким образом, четыре концентрации биогенных аминов содержатся в растворе A (20, 10, 5 и 1 мг/л), и четыре концентрации биогенных аминов содержатся в растворе B (5, 2,5, 1,25 и 0,25 мг/л).

Хранение

Растворы хранятся при температуре – 20°C.

6. Оборудование и аппаратура

- 6.1 мензурки объемом 25 мл
- 6.2 мензурки объемом 250 мл
- 6.3 мензурки объемом 2000 мл
- 6.4 волюметрические колбы объемом 10 мл
- 6.5 волюметрические колбы объемом 25 мл
- 6.6 волюметрические колбы объемом 50 мл
- 6.7 волюметрические колбы объемом 100 мл
- 6.8 волюметрические колбы объемом 250 мл
- 6.9 волюметрические колбы объемом 1000 мл
- 6.10 волюметрические колбы объемом 2000 мл
- 6.11 градуированная мензурка объемом 100 мл
- 6.12 градуированная мензурка объемом 500 мл

- 6.13 градуированная мензурка объемом 1000 мл
- 6.14 градуированная мензурка объемом 2000 мл
- 6.15 автоматическая пипетка объемом 200 мкл
- 6.16 автоматическая пипетка объемом 1 мл
- 6.17 5 мл автоматическая пипетка
- 6.18 автоматическая пипетка объемом 10 мл
- 6.19 наконечники объемом 1 мл, 5 мл и 10 мл автоматических пипеток
- 6.20 емкости объемом 2 л с крышкой
- 6.21 пробирки для гидролиза Pyrex объемом 10 мл с винтовой крышкой
- 6.22 тары с винтовой крышкой объемом 2 мл, адаптированные к автоматическому пробоотборнику
- 6.23 весы для взвешивания от 0 до 205 г
- 6.24 магнитная мешалка
- 6.25 высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)
- 6.26 программное обеспечение для сбора данных
- 6.27 детектор диодно-матричный (диодная матрица)
- 6.28 колонка октадецилового типа (например, HP® C18 - HL, 250 мм x 4,6 мм, 5 мкм).
- 6.29 сухая баня при 70 °C
- 6.30 пипетка Пастера
- 6.31 ультразвуковая ванна

7. Отбор (подготовка проб)

Этот метод не требует специального отбора, поскольку анализируемое вино в объеме 1 мл отбирается и помещается непосредственно в пробирку для гидролиза Pyrex объемом 10 мл с завинчивающейся крышкой (6.21) (см. процедуру).
Однако рекомендуется проводить реакцию дериватизации с (диэтил)этоксиметиленмалонатом (DEEMM) сразу после получения образца, поскольку концентрация гистамина в вине может снижаться с течением времени.

8. Проведение исследования

8.1 Тестируемый образец

Все манипуляции следует проводить в вытяжном шкафу из-за токсичности некоторых реагентов.

Если в буферном растворе содержатся кристаллы бората, его нагревают до 50°C, перемешивая (на начальном этапе не интенсивно, пока раствор не нагреется).

Чтобы избежать риска адсорбции на наконечниках автоматических пипеток, рекомендуется использовать микропипетки следующим образом:

- Предварительно смачивают конус один раз раствором для отбора проб
- Добавляют раствор в приемник, не ополаскивая наконечник содержимым приемника, если не указано иное

Перед использованием растворы хорошо встряхивают (особенно замороженное вино).

В пробирку для гидролиза Pyrex объемом 10 мл с завинчивающейся крышкой (6.21) с помощью подходящих микропипеток вводят:

-1,75 мл буферного раствора бората (5,2)

- 750 мкл метанола (4.1.15)

- 1 мл образца, подлежащего дериватизации (автоматическая пипетка на 1 мл) (6.16)

- 40 мкл внутреннего стандартного раствора (2,4,6 TPA до 2 г/л) (5.1)
- 30 мкл DEEMM (4.1.13)

Пробирку закрывают (плотно затягивая, чтобы избежать испарения) и встряхивают вручную. Включают сухую баню (6.29) на 70°C.
Помещают пробирку в ультразвуковую баню (6.31) на 30 минут (2 раза по 15 минут, перемешивая каждые 5 минут). Всегда используется пластиковый штатив, подходящий для водяной бани, так как при использовании металлического штатива дериватизация проходит неудовлетворительно.
Нагревают реакционную смесь до 70°C в течение 1 часа на сухой бане (6.29) для распада избытка DEEMM.
Выключают сухую баню

После того как реакционная смесь вернется к комнатной температуре, флаконы объемом 2 мл заполняются с помощью пипеток Пастера (6.30) (пипетку Пастера меняют с каждой пробиркой). Перед отбором проб пробирки встряхивают вручную.

8.2 Условия эксплуатации

Ниже приведены в качестве примера условия эксплуатации.

Подвижная фаза:

- A: 25 мМ ацетатного буфера + 0,02% азида натрия pH 5,8 :

- B: ацетонитрил/метанол (80/20):

Градиентное элюирование происходит следующим образом со скоростью потока 0,9 мл/мин:

Время (мин)	% A	% B
0	90	10
5	90	10
10	83	17
35	60	40
43	28	72
48	18	82
52	0	100
57	0	100

Температура колонки: 15°C
Длина волны детекции: 280 нм
Скорость потока: 0,9 мл/мин
Объем вводимого вещества: 5 мкл
Время проведения анализа: 57 минут
Идентификация биогенных аминов:
Биогенные амины идентифицируются по времени их удерживания. Для этого каждый биогенный амин анализировался отдельно с целью определения его времени удерживания (Tr).

Амины		**Среднее Tr (мин)**
Гистамин	HI	25.46
Метиламин	ME	33.11
Этиламин	ET	39.00
Тирамин	TY	41.50
Путресцин	PU	46.00
Кадаверин	CA	48.00
Фенетиламин	PH	48.75
Изоамиламин	IS	50.25
Внутренний стандарт	2,4,6-TPA	54.75

9. Расчеты (Результаты)

Погрешность, вызванная неопределенностью в отношении выхода дериватизации и объема инъекции, может быть скорректирована с помощью внутреннего стандарта.
После корректировки значения пика концентрация биогенного амина рассчитывается на основе значения угла сдвига в стандартном диапазоне соответствующего биогенного амина. Для этого для каждой серии анализов также дериватизируется и вводится стандартный диапазон.
Результаты выражаются в мг/л с точностью до одной цифры после запятой.

10. Контроль качества

Контроль качества может проводиться с использованием сертифицированных эталонных материалов, вин, характеристики которых получены на основе консенсуса, или вин, в которые регулярно вносились стандартные добавления в течение аналитической серии и в соответствии с прилагаемыми контрольными картами.

11. Характеристики метода: параметры внутрилабораторного контроля

Параметры валидации были определены в соответствии [4].

11.1 Линейность

Для анализа линейности был выбран подход, заключающийся в сравнении остаточных стандартных отклонений линейной регрессионной модели и полиномиальной регрессионной модели второго порядка.
Анализ проводился на двух различных винах, пропитанных биогенными аминами в концентрациях 0, 1, 5, 10 и 20 мг/л (раствор A) и 0, 0,25, 1,25, 2,5 и 5 мг/л (раствор B).
Результаты по биогенным аминам:

иогенный мин	**S_{res} Линейность**	**S_{res} Второго порядка**	**DS 2**	**PG**	**F (5%)**	**Вывод**
Метиламин	0.766	0.606	3.218	8.757	4.75	Линейный
Этиламин	0.371	0.371	0.140	1.014		Линейный
Тирамин	1.065	1.065	1.135	1.000		Линейный
Путресцин	0.524	0.523	0.286	1.043		Линейный
Кадаверин	0.276	0.267	0.134	1.881		Линейный
Фенетиламин	0.251	0.248	0.082	1.328		Линейный
Изоамиламин	0.216	0.215	0.055	1.199		Линейный
Гистамин	0.591	0.589	0.316	1.084		Линейный

11.2 Специфичность

Принцип измерения специфичности заключается в исследовании линии регрессии $r = a + bv$ и проверке того, что наклон b равен 1 ($T_{набл} < T_{критич}$), точка перехвата равна 0 ($T'_{набл} < T_{критич}$). Гипотезы проверяются с помощью t-теста с риском ошибки 1%.
Значение $T_{критич}$, связанное с 1% риском ошибки для 3 степеней свободы, составляет 4,541.

Результаты по биогенным аминам:

Биогенный амин	**Вино A**		**Вино B**		**Вино C**		**Вино D**	
	$T_{набл}$	$7'_{набл}$	$T_{набл}$	$7'_{набл}$	$T_{набл}$	$7'_{набл}$	$T_{набл}$	$7'_{набл}$
Метиламин	4.482	2.321	2.933	0.013	1.563	0.007	5.199	2.864
Этиламин	0.411	0.002	0.081	0.010	0.546	10.556	0.169	2.537
Тирамин	1.834	0.005	0.636	0.005	2.151	4.485	3.420	37.419
Путресцин	7.605	0.041	0.604	0.000	3.257	0.064	2.135	0.011
Кадаверин	5.499	0.033	1.719	1.314	10.929	0.049	8.466	0.026
Фенетиламин	3.348	0.016	1.265	0.001	10.238	0.034	5.925	0.009
Изоамиламин	12.980	0.016	2.297	0.004	12.996	0.020	11.121	0.000
Гистамин	4.978	0.250	1.222	0.006	3.128	0.014	1.229	0.004

11.3 Повторяемость

Для настоящего исследования повторяемости было отобрано семь различных красных вин, и для каждого из них было проведено три различных повтора. Концентрации составляли от 0,5 мг/л до 15 мг/л в зависимости от биогенного амина и вина.

Биогенный амин	**S_r (мг/л)**	**r (мг/л)**	**Диапазон валидации (мг/л)**
Метиламин	0.335	0.937	3 - 16
Этиламин	0.173	0.486	2 - 7
Тирамин	0.276	0.773	2 - 20
Путресцин	0.500	1.400	7 - 26
Кадаверин	0.025	0.069	0.2 - 0.8
Фенетиламин	0.028	0.079	0.3 - 1.1
Изоамиламин	0.017	0.048	0.1 - 0.8
Гистамин	0.108	0.303	5 - 16

11.4 Воспроизводимость

Для исследования воспроизводимости были выбраны три сорта красного вина, с каждым из которых было проведено по два повторных анализа.

Биогенный амин	**S_r (мг/л)**	**R (мг/л)**	**Диапазон валидации (мг/л)**
Метиламин	0.533	1.492	3 - 16
Этиламин	0.884	2.475	2 - 7
Тирамин	0.341	0.955	2 - 20
Путресцин	0.419	1.172	7 - 26
Кадаверин	0.172	0.482	0.2 - 0.8
Фенетиламин	0.053	0.150	0.3 - 1.1
Изоамиламин	0.056	0.157	0.1 - 0.8
Гистамин	1.333	3.732	5 - 16

11.5 Пределы обнаружения (LOD) и пределы количественного определения (LOQ)

Данные внутрилабораторного исследования методом последовательных разведений из раствора до 0,5 мг/л, последовательно разбавленного до 0,01 мг/л :

Амин		LD (мг/л)	LQ (мг/л)
Метиламин	HI	0.167	0.500
Этиламин	ME	0.083	0.250
Тирамин	ET	0.150	0.450
Путресцин	TY	0.078	0.235
Кадаверин	PU	0.033	0.098
Фенетиламин	CA	0.160	0.480
Изоамиламин	PH	0.032	0.096
Гистамин	IS	0.007	0.020

12. Библиография

[1] Gomez-Alonzo S., Hermosin-Gutierrez I., Garcia-Romero E., 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium Ion as Aminoenone derivatives in wine and beer samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 608-613.

[2] Tricard C., Cazabeil J.-M., Salagoïti M.H. (1991): dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, Analusis, 19, M53-M55.

[3] RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES - OIV, Amines biogènes par HPLC, Méthode OIV-MA-AS315-18 , Analyse des amines biogènes des moûts et des vins par HPLC (Résolution OIV-Oeno 346-
2009).

[4] "Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative". Oeno Resolution 10/2005. OIV. October 2005. www.oiv.int.

Метод OIV-MA-AS315-27 Метод IV типа

Анализ летучих соединений в винах с помощью газовой хроматографии

(Резолюция OIV-OENO 553/2016)

1 Введение

Данный метод применим для анализа летучих соединений в винах, содержащих менее 20 г/л сахара.

Для вин с содержанием сахара более 20 г/л и для мистелей необходима предварительная дистилляция (идентичная той, что практикуется для получения объёмной доли спирта); однако дистилляция иногда удаляет значительную долю содержащихся веществ.

2 - Область применения

Данный метод может быть использован для количественного определения следующих соединений (неполный список):

- этаналь,
- этилацетат,
- метанол,
- бутан-2-ол,
- пропан-1-ол,
- 2-метилпропан-1-ол,
- изоамилацетат,
- бутан-1-ол,
- 2-метилбутан-1-ол,
- 3-метилбутан-1-ол,
- пентан-1-ол,
- ацетоин,
- этиллактат,
- гексан-1-ол,
- 3-этоксипропанол,
- каприловокислый этил
- фурфурол,
- (2R,3R)-бутан-2,3-диол,
- (2R,3S)-бутан-2,3-диол,

- пропан-1,2-диол,
- бутиролактон,
- диэтил сукцинат,
- капроновая кислота (полуколичественное определение),
- 2-фенилэтиловый спирт,
- диэтилмалонат,
- каприловая кислота (полуколичественное определение),
- каприновая кислота (полуколичественное определение).

Примечание: диацетил и уксусная кислота не могут быть количественно определены этим методом, однако они появляются на хроматограммах.

3 Сущность метода

Летучие соединения количественно определяются методом газовой хроматографии после непосредственного введения образца, добавленного с внутренним стандартом, в капиллярную колонку, покрытую связанной полярной фазой. Для обнаружения используется ионизация пламени.

4 Реагенты и материалы

Количество и способ приготовления приведены в качестве примера и могут быть изменены в зависимости от типа вина.

4.1-деминерализованная вода (например, ISO 3696 тип II удельное сопротивление ≥ 18 М Ом-см);
4.2 - этанол [CAS № 64-17-5], чистота ≥ 96 %;
4.3 - водород высокой чистоты для ГХ (например, $H_2O \leq 4$ ppm; $O_2 \leq 2$ ppm; $C_nH_m \leq 0{,}5$ ppm; $N_2 \leq 4$ ppm);
4.4 - высокочистый гелий для ГХ ($H_2O \leq 3$ ppm; O2 ≤ 2 ppm; $C_nH_m \leq 1$ ppm; $N_2 \leq 5$ ppm);
4.5 - высокочистый сжатый воздух для ГХ;
4.6 - этаналь [CAS № 75-07-0], чистота ≥ 99%;
4.7 - этилацетат [CAS № 141-78-6], чистота ≥ 99,5%;
4.8 - метанол [CAS № 67-56-1], чистота ≥ 99,8%;
4.9 - диацетил [CAS № 431-03-08], чистота ≥ 99%;
4.10 - бутан-2-ол [CAS № 15892-23-6], чистота ≥ 99,5%;
4.11 - пропан-1-ол [CAS № 71-23-8], чистота ≥ 99,5%;
4.12 - 2-метилпропан-1-ол [CAS № 78-83-1], чистота ≥ 99,5%;
4.13 - изоамилацетат [CAS № 123-92-2], чистота ≥ 97%;
4.14 - бутан-1-ол [CAS № 71-36-3], чистота ≥ 99,5%;
4.15 - 4-метилпентан-2-ол (внутренний стандарт) [CAS № 108-11-2], чистота ≥ 99%;
4.16 - 2-метилбутан-1-ол [CAS № 137-32-6], чистота ≥ 99%;
4.17 - 3-метилбутан-1-ол [CAS № 125-51-3], чистота ≥ 99,5%;

4.18 - пентан-1-ол [CAS № 71-41-0], чистота ≥ 99%;
4.19 - ацетоин [CAS № 513-86-0], чистота ≥ 96%;
4.20 - этиллактат [CAS № 687-47-8], чистота ≥ 98%;
4.21 - гексан-1-ол [CAS № 111-27-3], чистота ≥ 99,0%;
4.22 - 3-этоксипропанол [CAS № 111-35-3], чистота ≥ 97%;
4.23 - этил октаноат [CAS № 106-32-1], чистота ≥ 99%;
4.24 - фурфурол [CAS № 98-01-1], чистота ≥ 99,0%;
4.25 - уксусная кислота [CAS № 64-19-7], чистота ≥ 99%;
4.26 - (2R,3R)- и (2R,3S)-бутан-2,3-диол [CAS № 513-85-9], чистота ≥ 98%;
4.27 - пропан-1,2-диол [CAS № 57-556], чистота ≥ 99,5%;
4.28 - бутиролактон [CAS № 96-48-0], чистота ≥ 99%;
4.29 - диэтил сукцинат [CAS № 123-25-1], чистота ≥ 99%;
4.30 - капроновая кислота [CAS № 142-62-1], чистота ≥ 99,5%;
4.31 - 2-фенилэтиловый спирт [CAS № 60-12-8], чистота ≥ 99%;
4.32 - диэтилмалонат [CAS № 7554-12-3], чистота ≥ 97%;
4.33 - каприловая кислота [CAS № 124-07-2], чистота ≥ 99,5%;
4.34 - каприновая кислота [CAS № 334-48-5], чистота ≥ 99,5%.

Примечание: диацетил и уксусная кислота не могут быть количественно определены этим методом, однако они появляются на хроматограммах.

Приготовление растворов реагентов (количества приведены в качестве примера и могут быть изменены в зависимости от типа анализируемой матрицы)

4.35 - 10% водно-спиртовая смесь, состоящая из этанола (4.2) и воды (4.1).

4.36 - Раствор внутреннего стандарта

Вводят 1 мл 4-метилпентан-2-ола (4.15) в колбу емкостью 100 мл (5.2). Заполняют до калибровочной метки этанолом (4.2). Разделяют на колбы с отметкой даты приготовления. Хранят в холодильнике.

4.37 - Внутреннее или внешнее эталонное вино (вино CRM (Сертифицированный эталонный материал) или вино, используемое в качестве эталонного материала в рамках программы проверки соответствия между лабораториями, например).

4.38 - Стоковый калибровочный раствор

Соединения взвешиваются индивидуально с точностью ± 1 мг (номинальные веса приведены в таблице ниже) с помощью прецизионных весов (5.4). Во избежание потерь при испарении, сразу добавляются небольшое количество этанола (4.2). Перемешивают и переливают в колбу емкостью 1 л (5.3). Промывают этанолом. Добавляют 2,5 мл 4-метилпентан-2-ола (4.15). Доводят объем до 1 л этанолом (4.2) и перемешивают. Разделяют по колбам. Раствор хранят в морозильной камере. Записывают точные веса.

Состав	**Номинальный вес (мг)**	**Конечная концентрация в рабочем калибровочном растворе 4,39 (мг/л)**	**Состав**	**Номинальный вес (мг)**	**Конечная концентрация в рабочем калибровочном растворе 4,39 (мг/л)**
Этаналь (4.6)	500	50	Гексан-1-ол (4.21)	300	30
Этилацетат (4.7)	1500	150	3-Этоксипропанол (4.22)	160	16
Метанол (4.8)	650	65	Фурфурол (4.24)	50	5
Диацетил (4.9)	50	5	Этил октаноат (4.23)	120	12
Бутан-2-ол (4.10)	160	16	Уксусная кислота (5.25)	5000	500
Пропан-1-ол (4.11)	350	35	Бутан-2,3-диол (4.26)	4000	400
2-Метилпропан-1-ол (4.12)	240	24	Пропан-1,2-диол (4.27)	1000	100
Изоамилацетат(4.13)	250	25	Бутиролактон (4.28)	50	5
Бутан-1-ол (4.14)	160	16	Диэтил сукцинат (4.29)	500	50
2-Метилбутан-1-ол (4.16)	160	16	Капроновая кислота (4.30)	250	25
3-Метилбутан-1-ол (4.17)	1000	100	2-фенилэтанол (4.31)	500	50
Пентан-1-ол (4.18)	160	16	Диэтилмалонат (4.32)	1000	100
Ацетоин (4.19)	250	25	Каприловая кислота (4.33)	500	50
Этиллактат (4.20)	1500	150	Каприновая кислота (4.34)	750	75

4.39 - Рабочий калибровочный раствор

Непосредственно перед использованием разбавляют основной калибровочный раствор (4.38) в десять раз.

5 - Аппаратура

5.1 - волюметрические колбы объемом 20 мл (класс А);
5.2 - волюметрические колбы объем 100 мл (класс А);
5.3 - волюметрические колбы объемом 1 л (класс А);
5.4 - прецизионные весы с точностью ± 1 мг;
5.5 - газовый хроматограф, оснащенный:
- инжектором для ввода проб с делением/без деления потока,
- автодозатором (опционально),
- детектором: пламенно-ионизационный (FID);

5.6 - капиллярная колонка из плавленого кварца:
- Тип Carbowax 20 M со связанной полярной фазой,
- длина 50 м,
- внутренний диаметр 0,32 мм,
- толщина пленки 0,45 мкм.

Примечание: другие системы могут быть использованы при условии, что они способны удовлетворительно разделять различные компоненты.

6 - Подготовка образцов

Проводится предварительная дегазация образцов игристых вин (например, предварительный сбор пробы в пробирку с помощью автоматической пипетки).

Перед подготовкой перегоняют вина, содержащие более 20 г/л сахара, и мистели.

Вводят образец в колбу емкостью 20 мл (5.1). Добавляют 0,5 мл раствора внутреннего стандарта (4.36) и заполняют до калибровочной метки вином.

7 - Проведение исследования

Анализ проводят с помощью газового хроматографа (5.5), оснащенного капиллярной колонкой (5.6).

Аналитические условия (приведены в качестве примера):

Газ-носитель (4.4): $P_{гелий}$ = 90 кПа

Примечание: можно использовать другой газ-носитель, например водород, азот рекомендуется не использовать.

Скорость деления потока: 2,5 мл/мин
Режим разделения потока: 40 мл/мин
Режим раздельного впрыска
Объем впрыскиваемого вещества: 1 мкл
Температура инжектора: 200°C
Детектор: пламенно-ионизационный (FID)
Температура детектора при 250 °C
Пламя: $P_{водород\ (4.3)}$ = 50 кПа и $P_{воздух\ (4.5)}$ = 130 кПа
Программирование температуры:
. темп. 1 = 32 °C при 2,5 °C/мин, до 80 °C - t_1 = 0 мин.
. темп. 2 = 80 °C при 4 °C/мин, до 170 °C - t_2 = 20 мин.
. темп. 3 = 170 °C при 10 °C/мин, до 220 °C - t_3 = 20 мин.

Калибровка

Вводят рабочий калибровочный раствор (4.39) перед каждой серией анализа.
Расчет коэффициентов отклика:

$RF_i = (area_i \times Cc_{IS}) / (Cc_i \times area_{IS})$

Cc_i = концентрация компонента калибровочного раствора
$Area_i$ = площадь компонента калибровочного раствора
Cc_{IS} = концентрация внутреннего стандарта в калибровочном растворе
$Area_{IS}$ = площадь внутреннего стандарта в калибровочном растворе

Также можно использовать калибровочный график.

В качестве примера в Приложениях приведены хроматограммы стандартного раствора и образца вина.

8 - Расчеты

В при использовании фактора отклика расчет концентраций производится следующим образом:
$Cc_i = (area_i \times Cc_{iS}) / (RF_i \times area_{IS})$.

9 - Характеристики точности метода

См. Приложение C.

10 - Обеспечение качества и контроль

Прослеживаемость до международных стандартов по массе, объему и температуре.

Для внутреннего контроля качества используются синтетические смеси или образцы, полученные, например, при проведении квалификационного испытания. Может быть использована контрольная карта.

11 – Результаты

Выражают концентрацию в мг/л с точностью до десятичных знаков, указанных ниже.

Аналитические параметры	Количество десятичных знаков	Аналитические параметры	Количество десятичных знаков
Этаналь	0	Этиллактат	0
Этилацетат	0	Гексан-1-ол	1
Метанол	0	3-Этоксипропанол	0
Диацетил	1	Этил октаноат	0
Бутан-2-ол	0	Фурфурол	1
Пропан-1-ол	0	(2R,3R)-бутан-2,3-диол	0
2-Метилпропан-1-ол	1	(Мезо)-бутан-2,3-диол	0
Изоамилацетат	1	Пропан-1,2-диол	0
Бутан-1-ол	0	Бутиролактон	0
2-Метилбутан-1-ол	0	Диэтил сукцинат	0
3-Метилбутан-1-ол	1	2-фенилэтанол	0
Пентан-1-ол	0	Диэтил малат	0

Приложение A

Библиография

BERTRAND A., GUEDES DE PINHO P. and ANOCIBAR BELOQUI A. (1994). *Les constituants majoritaires du vin*, FV 971, OIV, 15 pages.

ПРИЛОЖЕНИЕ B

Примеры хроматограмм

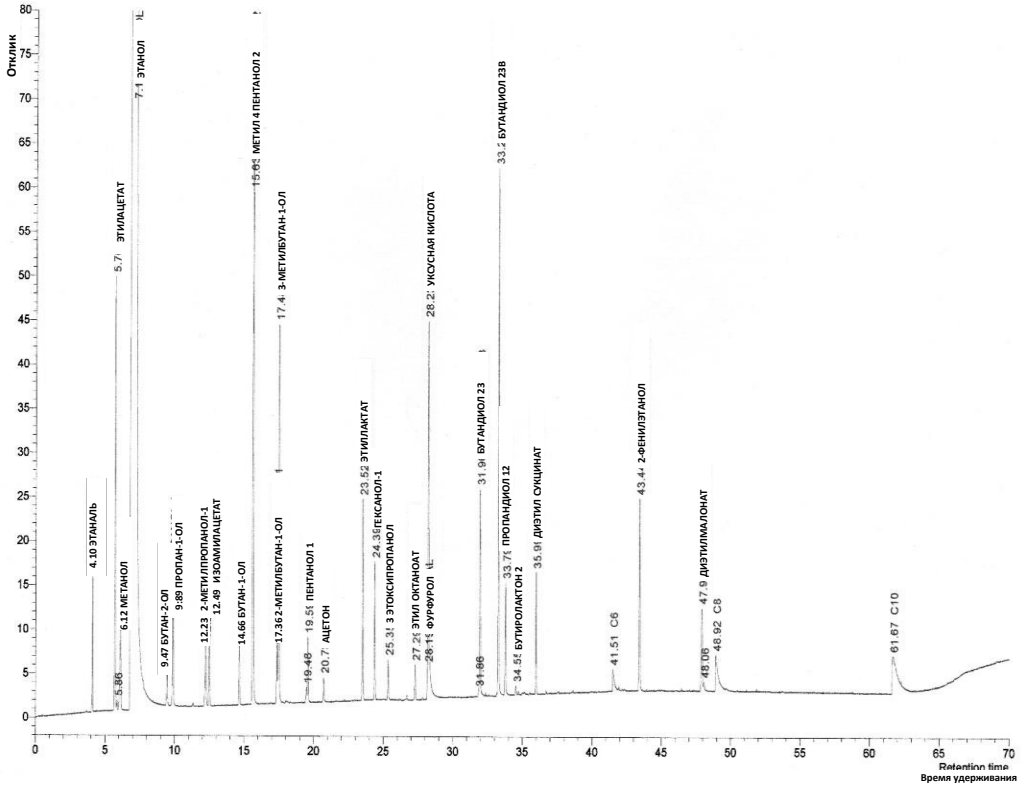


Рисунок 1: хроматограмма стандартного раствора летучих соединений

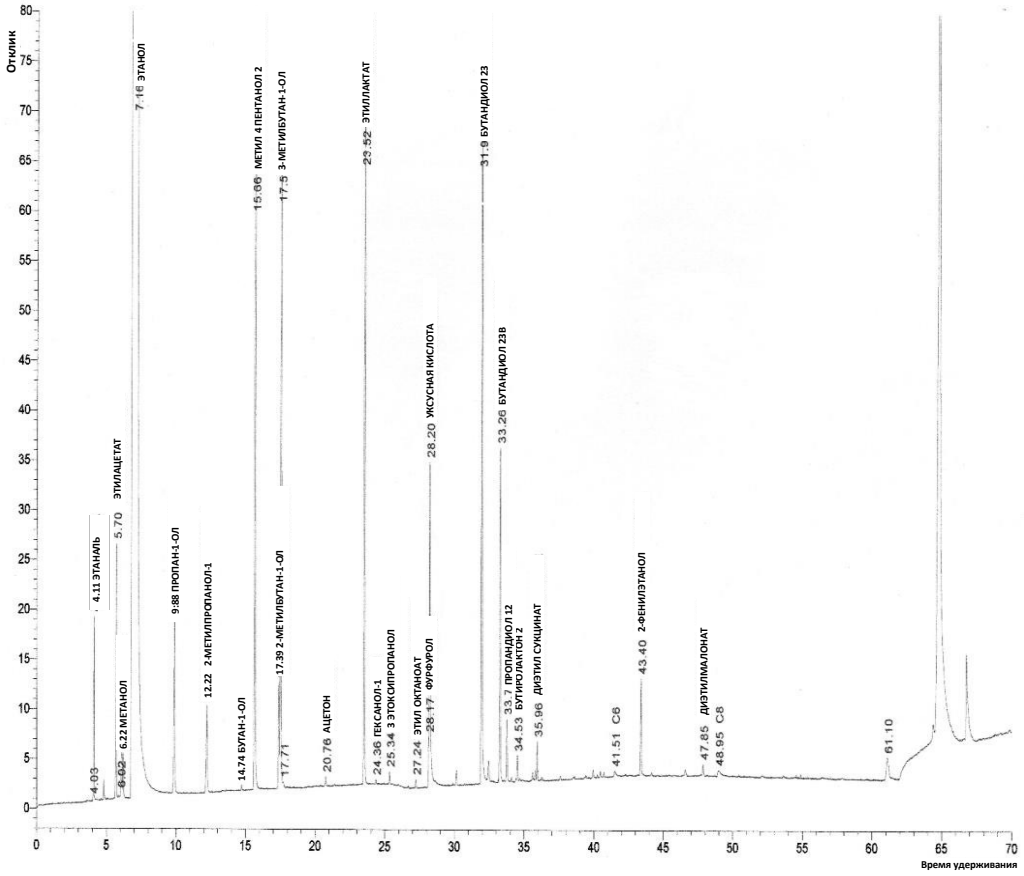


Рисунок 2: хроматограмма летучих соединений в белом вине (сахар < 15 г/л)

Метод OIV-MA-AS315-28 Метод IV типа

Метод определения 1,2-пропандиола и 2,3-бутандиола

(Резолюция OIV-OENO 589/2017)

1. ВВЕДЕНИЕ

После процессов ферментации образуются измеримые количества 1,2-пропандиола и 2,3-бутандиола. Эти соединения практически отсутствуют в неферментированном сусле, но в определенных пределах содержатся в винах.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Аналиты и внутренний стандарт экстрагируются с помощью этилового эфира. Их перенос в органическую фазу облегчается за счет повышения ионной силы исходного вина или сусла. Для этого к образцу добавляют большое количество K_2CO_3 ("высаливание"). Экстракты анализируются непосредственно с помощью ГХ-МС на полярной колонке. Обнаружение проводится в соответствии со временем удерживания и масс-спектрометром.

3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод подходит для определения 1,2-пропандиола и 2,3-бутандиола в суслах и винах с содержанием сахара более 20 г/л и концентрацией аналита от 1 мг/л до 500 мг/л.

4. АББРЕВИАТУРА

C	Концентрация
PG	1,2- пропандиол
GC-MS	Газовый хромато-масс-спектрометр
H_2	Водород
IS	Внутренний стандарт 1,3-бутандиола
m/z	Отношение масса/заряд
RF	Коэффициент отклика
ML	Матричный калибровочный уровень

SS	Стоковый раствор
CS	Калибровочный раствор
RT	Время удерживания
CS	Калибровочные растворы для газовой хроматографии
BG	2,3- Бутандиол
S	Вино с содержанием сахара > 20
г/л М	Сусло

5. РЕАКТИВЫ

5.1. K_2CO_3 (CAS № 584-08-7)

5.2. Этиловый эфир (CAS № 60-29-7)

5.3. Абсолютный этанол (CAS № 64-17-5)

5.4. Фруктоза (CAS № 57-48-7)

5.5. Глюкоза (CAS № 50-99-7)

5.6. Глицерин (CAS № 56-81-5)

5.7. 1,2-пропандиол, чистота > 99% (CAS № 57-55-6)

5.8. 2,3-2,3-Бутандиол, чистота > 99%, смесь (R,R)- и (R,S)-изомеров (CAS № 513-85-9). Оценивается относительное количество форм (R,R) и (R,S) следующим образом:

5.8.1. Готовится раствор 100 мг/л, следуя инструкциям в пунктах 7.2.1 и 7.3, с разбавлением смеси изомеров 2,3-бутандиола (5.8) в воде (5.10), а не в матричном растворе;

5.8.2. Раствор вводится в ГХ при условиях, описанных в п. 7.6, и процентное содержание форм (R,R) и (R,S) рассчитывается из процентного соотношения площадей двух пиков;

5.8.3. относительное количество двух форм учитывается для расчета концентрации калибровочных растворов, $C_{CS,i}$, используемых в пункте 8.2.1 для расчета RF_i, относящихся к формам (R,R) и (R,S).

5.9. 1,3-Бутандиол, чистота > 99%, безводный (или обезвоженный сульфатом натрия в течение 24 часов) (CAS № 107-88-0)

5.10. Очищенная вода для лабораторного использования, сертифицированная по стандарту EN ISO 3696

5.11. Азот

6. АППАРАТУРА

6.1. Лабораторные приборы общего пользования, такие как колбы класса А объемом 1000 мл, 200 мл и 100 мл

6.2. Аналитические весы с точностью ± 0,0001 г

6.3. Лабораторная центрифуга (не менее 4000 об/мин или 2000 xg).

Примечание 1. Единица "xg" относится к ускорению, которое испытывают частицы в центрифуге, а "об/мин" представляет собой число оборотов ротора центрифуги в минуту. Между этими единицами измерения существует взаимосвязь:
$xg = 1.1178 \cdot 10^{-3} \cdot n^2 \cdot r$. В лаборатории, разработавшей этот метод, r = 0.115 м.

6.4. Хроматограф, соединенный с масс-спектрометром и инжектором для ввода проб с делением/без деления потока

6.5. Высокоточные микропипетки и пипетки Пастера

6.6. Центрифужные пробирки объемом 30 мл, устойчивые к эфиру и оснащенные пробками

6.7. Водяная баня с терморегулятором

6.8. Вертикальная вихревая мешалка

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1. Подготовка модельных растворов, имитирующих матрицу

Подготовка модельных растворов, имитирующих матрицу

Для получения лучшего отклика ГХ-МС при количественном определении необходимо приготовить различные растворы, максимально имитирующие матрицу исследуемого образца, учитывая, что отклик при анализе гликолей меняется в зависимости от матрицы, в которой они были разведены.

Таблица 1: Приготовление модельных растворов в калибровочных колбах объемом 1000 мл.

	Модельный раствор	
	M	S
Фруктоза	100 г/л	50 г/л
Глюкоза	100 г/л	50 г/л
Глицерин	1 г/л	4 г/л
Абсолютный этиловый спирт	1% об./об.	5% об./об.

7.2. Приготовление эталонных растворов

7.2.1. SS: стоковые растворы PG и BG

С точностью до 0,1 мг взвешивают около 0,10 г 1,2-пропандиола (PG) и около 0,10 г 2,3-бутандиола (BG) в 10-мл калиброванной колбе и заполняют до калибровочной метки водой (5.10). Записывают результаты взвешивания. Герметично закрывают колбу и перемешивают.

Концентрация составляет приблизительно 10 мг/мл в растворе PG и 10 мг/мл в растворе BG.

Если количества PG и BG отличаются на 0,1 г, точные концентрации рассчитывают исходя из указанных весов.

2.2. IS: стоковый раствор

С точностью до 0,1 мг взвешивают около 0,10 г 1,3-бутандиола (IS) в калиброванной колбе объемом 10 мл и доливают до калибровочной метки водой (5.10). Записывают вес. Герметично закрывают колбу и перемешают. Концентрация этого раствора составляет 10 мг/мл.

Если количество IS отличается на 0,1 г, точную концентрацию рассчитывают на основании данных взвешивания.

7.3. Приготовление калибровочного матричного раствора

Калибровочные растворы готовятся следующим образом, путем разбавления раствора SS в модельном растворе, состав которого максимально приближен к составу образца для анализа (для сладкого вина – модельный раствор S; для сусла – модельный раствор M):

Таблица.2: Приготовление калибровочных растворов (CS) в калиброванных колбах объемом 100 мл:

	CS-M	**CS-S**
SS раствор	1 мл	1 мл
Для достижения конечного объема в 100 мл, раствор доводят до нужного объема с помощью:	модельный раствор M	модельный раствор S

Каждый калибровочный раствор CS содержит выбранную матрицу, а концентрация PG и BG составляет 100 мг/л. Внутренний стандарт добавляется перед экстракцией, как описано в пункте 7.5.

7.4. Подготовка образцов

Если концентрация аналита в пробе превышает максимальную концентрацию, предусмотренную областью применения, пробу разбавляют модельным раствором (7.1).

Образец перемешивают перед взятием 10 мл пробы.

Для анализа сусла или мутных вин берут пробу чистого вина после фильтрации.

Для игристых или полуигристых вин проводится дегазация, как описано в методе МОВВ "Общая кислотность" (OIV-MA-AS313-01, пункт 5.1). Выполняют все подготовительные работы и дважды проводят испытания.

7.5. Экстракция

7.5.1. Добавление внутреннего стандарта (IS) к образцу

Приготавливают раствор, содержащий 5 мл раствора IS (7.2.2) в колбе емкостью 100 мл и заполняют до калибровочной метки анализируемой пробой, затем хорошо встряхивают.
Данный раствор содержит 500 мг/л IS.

7.5.2. Сусла и вина с содержанием сахара> 20 г/л

7.5.2.1. Добавление K_2CO_3

Наливают 10 мл только что приготовленного раствора, состоящего из анализируемого образца и раствора IS, в центрифужную пробирку (6.6), затем добавляют 10 г K_2CO_3 (5.1) и дожидаются охлаждения. Для ускорения охлаждения можно использовать термостатированную водяную баню при температуре 20 °C (6.7).

7.5.2.2. Экстракция эфиром

После охлаждения добавляют 10 мл этилового эфира (5.2) и встряхивают всю смесь с помощью вертикальной вихревой мешалки, затем помещают ее в центрифугу (6.3) при приблизительно 3500 об/мин (или 1500 xg) в течение 10 минут.

7.5.3. Очистка для ГХ/МС анализа

Надосадочную жидкость собирают пипеткой Пастера, переносят в подходящую колбу и выпаривают растворитель под потоком азота. Остаток восстанавливают примерно 1 мл этилового эфира и помещают в плотно закрытый флакон для ГХ, готовый для ГХ/МС анализа.

7.5.4. Экстракция калибровочных растворов CS

Эта процедура также должна быть проведена для выбранного калибровочного раствора CS (7.3). Растворы CS должны рассматриваться так же, как и проба, начиная с момента добавления IS (7.5.1).

7.6. ГХ-МС анализ

В качестве примера ниже приведены конкретные параметры ГХ-МС анализа. Могут быть использованы альтернативные системы, если они дают адекватные хроматографические характеристики и позволяют разделить хроматографические пики с точностью более 2.

7.6.1. ГХ типичные условия
Колонка: 60 м x 0,25 мм x 0,25 мкм DB WAX
Газ-носитель: He
Поток газа-носителя: 1,0 мл/мин
Температура инжектора: 250 °C
Объем инжекции: 1 мкл
Ионизирующий ток: 70 эВ
Температурные настройки:

	Повышение (°C/мин)	**Температура (°C)**	**Время (мин.)**
Начало		50	8.00
скорость изменения температуры	4.0	220	
скорость изменения температуры		220	40

7.6.2. Конкретные условия МС
Источник: 230 °C
МС-детектор: сканирование при 150 °C, 35,00 - 350,00 а.е.м.
Время запуска: 10 мин
Время накопления для каждой массы: 250 мкс
Режим поглощения: Полное сканирование

8. ОЦЕНКА

8.1. Идентификация

Идентификация проводится путем сравнения времени удерживания калибровочных растворов, предоставленных для этой цели, и масс-спектра, найденного в соответствующей литературе, связанной с ГХ-МС.

8.2. Расчеты

Для количественного определения используется m/z = 45 для IS, а также PG и двух форм BG

8.2.1. Определение коэффициентов отклика

Количественное определение проводится на основе коэффициента отклика RF, полученного при анализе эталонного раствора:

$$RF_i = \frac{A_{IS}/C_{IS}}{A_{CS,i}/C_{CS,i}}$$

где:

A_{IS} - площадь пика внутреннего стандарта, C_{IS} - его концентрация;

A_{csi} - площадь пика PG или каждой изомерной формы BG в калибровочном растворе, C_{CSi} - его концентрация.

8.2.2. Расчет концентраций в образцах

После расчета коэффициента отклика RF можно рассчитать концентрацию PG и каждой из изомерных форм BG в образцах по следующей формуле:

$C_i = RF_i \times C_{CS} \times A_i/A_{is}$

где:

A_i - площадь пика PG или BG в образце, а C_i - его концентрация.

8.3. Выражение результатов

Результаты выражаются в мг/л с точностью до целого числа.

2,3-бутандиол выражается как сумма (R,R)-2,3-бутандиола и (R,S)-2,3-бутандиола.

9. Библиография

Carsten Fauhl, Reiner Wittkowski, Janice Lofthouse, Simon Hird, Paul Brereton, Giuseppe Versini, Michele Lees and Claude Guillou, ‘Gas Chromatographic/Mass Spectromctric Determination of 3-Methoxy-1,2-Propanediol and Cyclic Diglycerols, By-Products of Technical Glycerol, in Wine: Interlaboratory Study’, JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL, VOL. 87, NO. 5, 2004.

Di Stefano, R., Garcia Moruno, E. and Borsa, D., ‘Proposta di un metodo di preparazione del campione per la determinazione dei glicoli dei vini’, VINI D'lTALIA, 4, 1992, pp. 61-64.

Garcia Moruno, E. and Di Stefano, R., ‘La determinazione del glicerolo, del 2,3- butandiolo e dei glicoli nei vini’, VINI D'lTALIA, 5, 1989, pp. 41-46.

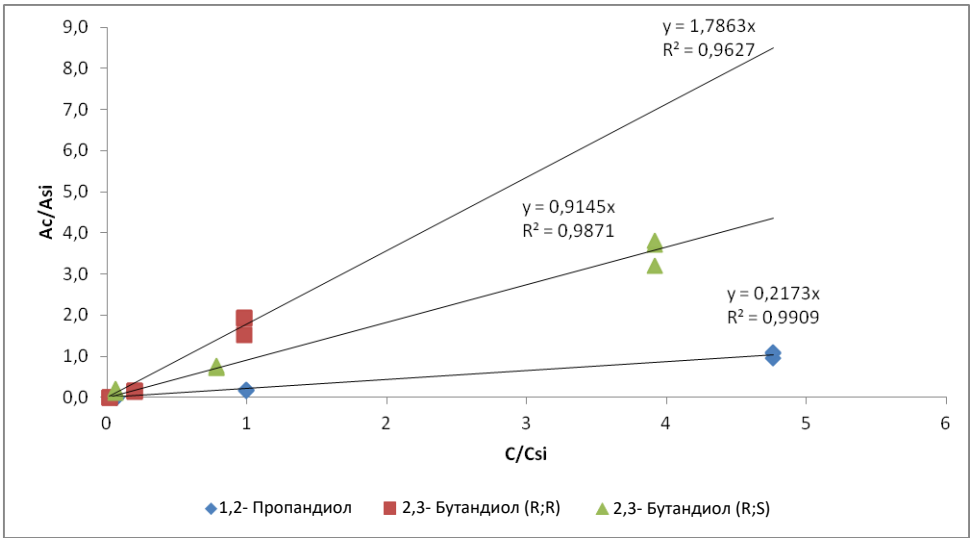
Di Stefano, R., Borsa, D. and Garcia Moruno, E., ‘Glicoli naturalmente presenti nei vini’, VINI D'lTALIA, 5, 1988, pp. 39-44.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ

1. Линейность

Проверка линейности отклика для раствора сахара 200 г/л (100 г/л глюкозы и 100 г/л фруктозы). Каждый аналит добавлялся в концентрациях 10, 100 и 500 мг/л, в то время как IS добавлялся в концентрации около 100 мг/л. Измерения повторяли три раза.



Средние коэффициенты отклика следующие:

1,2- Пропандиол	$RF = (C/C_{IS})/(A/A_{IS}) = 1/0.2173 = 4.60$
(R,R)-2,3- Бутандиол	$RF = (C/C_{IS})/(A/A_{IS}) = 1/1.7863 = 0.56$
(R,S)-2,3- Бутандиол	$RF = (C/C_{IS})/(A/A_{IS}) = 1/0.9145 = 1.09$

2. Повторяемость

Повторяемость оценивалась для двух образцов сусла.

Один был проанализирован как образец (сусло N°1), а другой был получен путем добавления к нему 100 мг/л исходного раствора SS (сусло N°2).

В следующей таблице приведены данные 10 повторных анализов, повторяемость (r) рассчитана по формуле r = 2,8*Sr. (Sr = стандартное отклонение повторяемости, RSDr = относительное стандартное отклонение повторяемости).

Состав	**Сусло N°1**				**Сусло N°2**			
	Среднее (мг/л)	**Sr (мг/л)**	**RSD r (%)**	**r (мг/л)**	**Среднее (мг/л)**	**Sr (мг/л)**	**RSD r (%)**	**r Dr (мг/л)**
1,2-Propanediol	1.5	0.5	36	1.5	107	9	9	30
(R,R)-2,3-Butane	3.2	1.6	52	4.6	30	3	9	9.0
(R,S)-2,3-Butane diol	5.4	1.7	33	4.9	104	11	10	34

Сусло №. 1

	среднее (мг/л) H	C 10^6 (м/м) H	PRSD (R)	R Horwitz	Horrat (r)	r мин.	r макс.
1,2-Пропандиол	1.5	1.5	15	0.6	2.40	0.2	0.8
(R,R)-2,3-Бутандиол	3.2	3.2	13	1.2	3.87	0.3	1.6
(R,S)-2,3-Бутандиол	5.4	5.4	12	1.9	2.64	0.5	2.5

Предел достоверности "r" не содержится в диапазоне валидации, определенном уравнением Горвица (r мин. H < r < r макс. H) из-за большой волатильности результатов измерений низких концентраций, близких к пределу количественного определения, установленному в пункте 5 Приложения 1.1.

Сусло №.2

	среднее (мг/л) H	r (м/м) H	PRSD (R)	C 10^6 r Horwitz	R (r)	Horrat мин.	Horrat макс.
1,2-Пропандиол	107	11	7.9	24	1.09	5.9	31.8
(R,R)-2,3-Бутандиол	30	3	9.5	8	0.98	2.0	10.7
(R,S)-2,3-Бутандиол	104	10	7.9	23	1.29	5.7	30.8

Предел достоверности "r" не содержится в диапазоне валидации, определенном уравнением Горвица (r мин. H < r < r макс. H).

3. Степень восстановления

Степень восстановления была оценена для сусла N°2 до и после добавления исходного раствора SS как описано в пункте 7.3 метода.

Состав	**С. в сусле (мг/л)**	**С. добавленн. (мг/л)**	**Теоретическ. С. (мг/л)**	**Измеренн. С. (мг/л)**	**Степень восстановления (%)**
1,2- Пропандиол	0.7	99.5	100.2	107.5	107
(R,R)-2,3- Бутандиол	12.6	21.7	34.3	29.9	87
(R,S)-2,3- Бутандиол	11.4	86.8	98.2	103.7	106
(R,R)- + (R,S)-2,3- Бутандиол	*24.0*	*108.5*	*132.5*	*133.6*	*101*

Степень восстановления удовлетворительная для 1,2-пропандиола и для 2,3-бутандиола, оцениваемого в целом как сумма обеих.

4. Влияние сахарной матрицы на коэффициенты отклика

Было проведено сравнение RF, полученных для эквимолярных растворов глюкозы и фруктозы с общей концентрацией сахара 200 г/л и 2 г/л.

	1,2- Пропандиол		(R,R)-2,3- Бутандиол		(R,S)-2,3- Бутандиол	
Сахара	200 г/л	2 г/л	200 г/л	2 г/л	200 г/л	2 г/л
RF	4.60	5.90	0.55	0.56	1.08	1.09
$\|\Delta RF\|$%	22.0 %		1.8 %		0.9 %	

Влияние матрицы на 1,2-пропандиол сильно выражено, в то время как для обеих форм 2,3-бутандиола оно незначительно.

5. Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) зависят от конкретных аналитико-химических условий измерения и должны быть определены всеми, кто использует метод.
Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) были оценены с использованием вышеупомянутого оборудования и условий (пункт 8) и в соответствии с инструкциями Резолюции OENO 7-2000 (OIV-MA-AS1-10) "Оценка пределов обнаружения и количественного определения метода анализа", как описано в пункте 4.2 относительно "Графического" подхода.

	1,2- Пропандиол	(R,R)-2,3- Бутандиол	(R,S)-2,3- Бутандиол
LOD (мг/л)	0.2	0.2	0.2
LOQ (мл/л)	0.6	0.7	0.8

Приложение 2

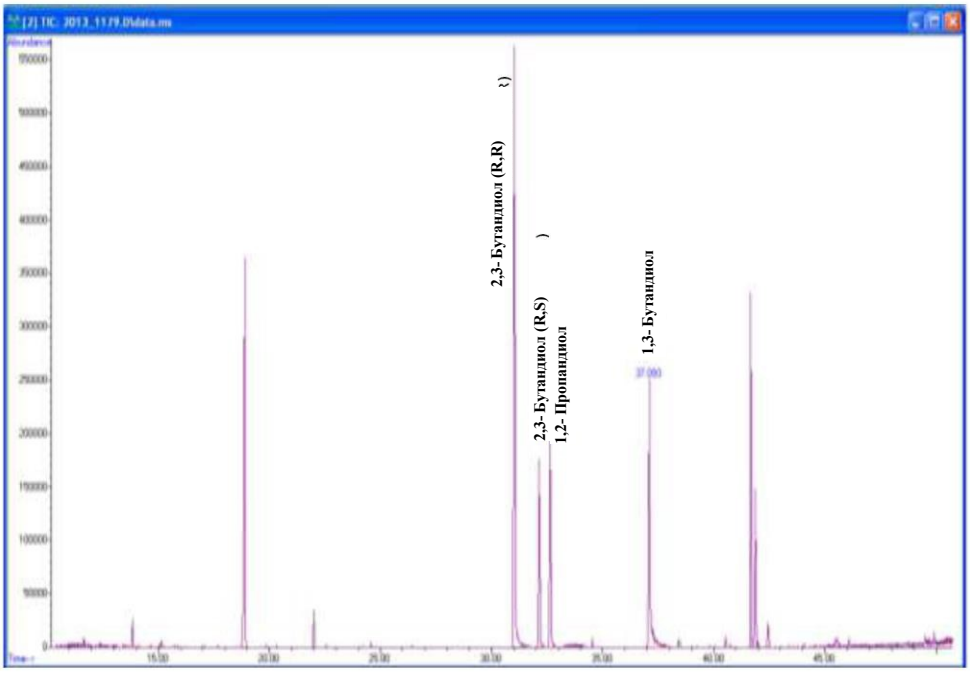


РИС. 1 Хроматограмма вина.

Метод OIV-MA-AS315-29 Метод IV типа

Обнаружение хитиназы и тауматин-подобных белков в белых винах (Резолюция OIV-OENO 529/2017)

1. Введение

Для выявления нестабильных белков и риска белкового касса (помутнения) в белых винах используются тесты, основанные на нагревании или выпадении осадка, в последнем случае используется химический агент. Эти тесты дают очень разные, ненадежные и даже противоречивые результаты. Иммуноферментный анализ позволяет определить наличие или отсутствие нестабильных белков в винах. Таким образом, хитиназа и тауматин-подобные белки могут быть обнаружены в винах с общей концентрации всего 1 мг/л. Это значение взято из сравнения результатов с методом SDS-электрофореза, описанным в *Сборнике методов анализа* (OIV-MAA-AS315-12), для которого предел обнаружения составляет 1 мг/л.

2. Область применения

Этот метод иммуноферментного анализа применим к белым винам.

3. Сущность метода

Метод иммуноферментного анализа включает 3 этапа:

3.1 Нанесение образца вина на нитроцеллюлозную мембрану

3.2 Обнаружение нестабильных белков

3.3 Выявление наличия нестабильных белков

Интенсивность окрашенных пятен, наблюдаемых на мембране, пропорциональна количеству нестабильных белков и риску белкового касса помутнения) в вине.

4. Реактивы и продукты

4.1 Список реактивов и продуктов

Если не указано иное, продукты используются согласно инструкции производителя.

- 4.1.1 Сверхчистая вода: удельное сопротивление ≥ 18 М Ом-см при 25 °C
- 4.1.2 Вино, насыщенное протеинами, и вино, не содержащее протеины после обработки бентонитом. Эти вина используются для положительного и отрицательного контроля соответственно: проверка и количественное определение белков, присутствующих в этих винах, могут быть проведены с помощью электрофореза SDS-PAGE (метод OIV-MA-AS315-12).
- 4.1.3 Кроличьи поликлональные антитела, направленные против нестабильных белков в вине: см. протокол в приложении.
- 4.1.4 Козьи анти-кроличьи IgA поликлональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (далее: козьи анти-раббит-HRP антитела).
- 4.1.5 Безводный хлорид натрия (NaCl): CAS № 7647-14-5
- 4.1.6 Безводный Tris-HCl: CAS № 1185-53-1
- 4.1.7 Концентрированная HCl в растворе; чистота ≥ 36,5%: CAS №. 7647-01-
  0
- 4.1.8 Твин 20: CAS № 9005-64-5
- 4.1.9 Лиофилизированный порошок бычьего сывороточного альбумина (БСА); чистота ≥ 96%: CAS № 9048-46-8
- 4.1.10 4-Хлор-1-нафтол; чистота ≥ 99%: CAS № 604-44-4
- 4.1.11 Метанол; чистота ≥ 99,8%: CAS № 67-56-1
- 4.1.12 Перекись водорода в растворе (H_2O_2); чистота ≥ 30%: CAS №. 7722-84-1

4.2 Приготовление рабочих растворов

Все растворы хранят в течение 1 года при температуре 4 °C.

4.2.1 TBS буфер (трис-буферизованный солевой раствор)

Растворяют 29,22 г хлорида натрия (4.1.5) и 2,42 г безводного Tris-HCl (4.1.6) в 1 л сверхчистой воды (4.1.1). Уровень pH регулируется до 7,5 с помощью концентрированного раствора HCl (4.1.7).

4.2.2 TBS-Твин 20 буфер

Добавляют 0,05% Твин 20 (4.1.8) в буфер TBS (4.2.1).

4.2.3 Блокирующий раствор

Добавляют 4% БСА (4.1.9) в буфер TBS (4.2.1).

4.2.4 Раствор поликлональных антител (доступный на рынке или в соответствии с протоколом, описанным в приложении)
4.2.4.1 Разводят нестабильные антибелковые поликлональные антитела (праймеры) в соответствии с коммерческими рекомендациями или с их концентрацией в буфере TBS (4.2.1).
4.2.4.2 Разводят козьи анти-раббит-HRP поликлональные антитела (вторичные) в соответствии с производственной рекомендацией или с их концентрацией в буфере TBS (4.2.1).

4.2.5 Растворы для выявления нестабильных белков
4.2.5.1 Растворяют 30 мг 4-хлор-1-нафтола (4.1.10) в 10 мл метанола (4.1.11). Помещают этот раствор в темное место в температурном режиме -20 °C до тех пор, пока он не будет использован.
4.2.5.2 Добавляют 30 мкл 30% H_2O_2 (4.1.12) в 50 мл TBS (4.2.1) непосредственно перед использованием.

5. Материалы

5.1 Список материалов для проведения реакции иммуноферментного анализа:
5.1.1 нитроцеллюлозная мембрана с порами 0,2 мкм для проведения иммуноферментного анализа;
5.1.2 автоматические пипетки на 0,5-10 мкл и 100-1000 мкл, соответствующие конусные фильтры;
5.1.3 пробирки, штатив для пробирок для разведений антител;
5.1.4 градуированные мензурки класса A;
5.1.5 абсорбирующая бумага;
5.1.6 пинцет;
5.1.7 лабораторная стеклянная посуда для проведения реакции: малый кристаллизатор, чашка Петри, пробирки, пробки и т.д.;
5.1.8 шейкер с платформой (для реакции в чашке) или вихревая мешалка (для реакции в пробирке) с максимальной скоростью 20 об/мин.

5.2 Оборудование, необходимое для приготовления растворов:
5.2.1 калиброванные колбы класса A;
5.2.2 pH-метр;
5.2.3 прецизионные весы с точностью до 0,1 мг;
5.2.4 центрифуга на 3000 г и центрифужные пробирки.

6. Отбор проб

Пробы следует отбирать и хранить при температуре 4°C, чтобы не модифицировать белки, естественно присутствующие в вине.

6.1 Подготовка проб

Пробы (или лабораторные образцы) вин наносятся непосредственно на нитроцеллюлозную мембрану (5.1.1) с помощью пипетки (5.1.2), без предварительной подготовки.

7. Проведение исследования

Анализ можно проводить на нефильтрованных винах при единственном условии, что эти вина не содержат бентонита во взвешенном состоянии. В этом случае проводят центрифугирование при 3000 г (5.2.4) в течение 10 мин при комнатной температуре.
Как указано в пункте 3, иммуноферментного анализа в 3 этапа, а реакции проводятся при комнатной температуре от 18 °C до 25 °C.

7.1 Применение пробы вина

Наносят 5 мкл (5.1.2) тестовых порций из образцов и стандартных колориметрических растворов на нитроцеллюлозную мембрану (5.1.1). Оставляют высыхать на 15-20 мин при комнатной температуре.

7.2 Добавление моноклональных антител

7.2.1 Помещают мембрану в чашку или пробирку (5.1.7). Объем растворов будет зависеть от емкости и размера мембраны. Мембрана должна быть накрыта.

Указанные ниже объемы предназначены для небольшого контейнера типа чашки Петри (5.1.7). Добавляют блокирующий раствор (4.2.3). Перемешивают не менее 30 минут (5.1.8).

7.2.2 Промывают, сливая раствор, при необходимости придерживая мембрану пинцетом, перед добавлением 20 мл TBS (4.2.1) и перемешивая в течение нескольких минут (5.1.8).
Промывают второй раз, как описано выше, и сливают раствор.

7.2.3 Добавляют 20 мл раствора первичных антител (4.2.4.1). Перемешивают в течение одного часа (5.1.8).
Промывают 3 раза раствором TBS-Твин 20 (4.2.2).

7.2.4 Добавляют 20 мл раствора вторичных антител коза-анти-кролик-HRP (4.2.4.2). Перемешивают в течение часа.

7.2.5 Промывают раствором TBS-Твин 20 (4.2.2), как описано выше, в течение 5 минут. Промывают 2 раза раствором TBS (4.2.1), как описано выше, в течение 15 мин.
Сливают раствор.

7.3 Выявление наличия нестабильных белков

7.3.1 Смешивают два раствора для выявления нестабильных белков (4.2.5.1 и 4.2.5.2) и помещают в контакт с мембраной (5.1.1), подготовленной в соответствии с протоколами 7.1 и 7.2, на которую было нанесено вино, и перемешивают.
На мембране, где присутствуют нестабильные белки, появляется черно-темно-фиолетовый или сиреневый осадок.
Интенсивность цвета зависит от концентрации нестабильных белков и, следовательно, от риска возникновения белкового касса.
Через 20-30 мин, когда пятно, соответствующее нанесению положительного стандартного колориметрического раствора (4.1.2), станет очень интенсивным, окрашивание останавливают, промыв нитроцеллюлозную мембрану (5.1.1) в воде.
Помещают мембрану для сушки между 2 листами абсорбирующей бумаги (5.1.5).
Результаты можно интерпретировать, когда мембрана высохнет.

8. Результаты

Для интерпретации результатов:

- в месте нанесения положительного стандартного колориметрического раствора должно появиться пятно высокой интенсивности цвета (темно-фиолетово-черное),
- место нанесения отрицательного стандартного колориметрического раствора не должно иметь пятен,
- фоновый "шум" (место на мембране, куда не был нанесен образец) должен быть очень светлым, в основном белым.

Полуколичественный результат может быть получен путем построения калибровочной кривой на основе вина, естественно богатого белками, для которого будет использоваться диапазон разбавления. Эта калибровочная кривая будет зависеть от площади поверхности, полученной путем интегрирования интенсивности цвета пятен, соответствующих образованию иммунокомплексов. Анализ может быть проведен с помощью того же оборудования, которое используется для анализа гелей электрофореза, описанного в Методе OIV-MA-AS315-.12. Интерпретация результатов также может быть проведена визуально.

8.1 Прямой контроль наличия или отсутствия нестабильных белков в вине

Белки присутствуют в лабораторном образце, если интенсивность цвета полученного пятна выше, чем интенсивность цвета пятна для отрицательного стандартного колориметрического раствора.
Интенсивность цвета пятна, полученного после реакции, пропорциональна количеству нестабильных белков и, следовательно, пропорциональна риску белкового касса в данном вине.

8.2 Проверка отсутствия протеинов после обработки (в частности, бентонитом)

Белки присутствуют в образце, если интенсивность цвета пятна, полученного для тестовой порции без обработки бентонитом, выше, чем интенсивность цвета пятна для отрицательного стандартного колориметрического раствора.

В случае применения "ряда продуктов обработки (бентонита)" в лабораторном испытании, интенсивность цвета пятен в каждой тестовой порции должна уменьшаться по мере увеличения концентрации продукта обработки. Если эта интенсивность нулевая или минимальная для одного пятна, но постоянная по отношению к другим образцам в диапазоне, то для достижения стабильности белка в тестируемом вине применяется доза продукта для обработки, соответствующая данному пятну.

9. Приложения

Получение поликлональных антител, направленных против нестабильных белков

Антитела, направленные против нестабильных белков в белых и розовых винах, могут быть получены у кроликов. Именно их специфичность делает метод надежным и точным.

9.1 Очистка хитиназы и тауматин-подобных белков

9.1.1 Перечень реактивов и оборудования

9.1.1.1 Сверхчистая вода: удельное сопротивление ≥ 18 Ом-см
9.1.1.2 Винный виноград, собранный в период технологической зрелости (Шардоне или Совиньон блан, например)
9.1.1.3 Ацетат натрия безводный: CAS № 127-09-3
9.1.1.4 Тритон X-100: CAS № 9002-93-1
9.1.1.5 Безводный сульфат аммония: CAS № 127-09-3
9.1.1.6 Безводный хлорид натрия (NaCl): CAS № 7647-14-5
9.1.1.7 Безводный Трис-HCl: CAS № 1185-53-1
9.1.1.8 37% чистая соляная кислота: CAS № 7647-01-0
9.1.1.9 1M раствора гидроксида натрия NaOH: CAS № 1310-73-2
9.1.1.10 Лабораторная стеклянная посуда, включая калиброванные колбы и пипетки класса A
9.1.1.11 Пинцет
9.1.1.12 Центрифуга на 10 000 г
9.1.1.13 Лабораторные весы с точностью до 0,1 мг
9.1.1.14 pH-метр
9.1.1.15 Сильная анионная смола
9.1.1.16 Анионная смола
9.1.1.17 Мембрана с отсечкой 10 кДа
9.1.1.18 Аппарат жидкостной хроматографии низкого давления с концентрационно-градиентным насосом
9.1.1.19 Детектор, измеряющий поглощение при 280 нм
9.1.1.20 Детектор проводимости

9.1.2 Подготовка буфера ацетата натрия (9.1.1.3), разбавленного до 50 мМ, 0,25% Тритона X-100 (9.1.1.4) при pH 5

Помещают в мерную колбу объем 1 л (9.1.1.10) последовательно следующие ингредиенты:
- 4,1 г ацетата натрия (9.1.1.3),
- 2,5 г Тритона X-100 (9.1.1.4),
- доводят до 1 л сверхчистой водой (9.1.1.1) и перемешивают; уровень pH регулируется до 5 с помощью 37% HCl (9.1.1.8), чтобы избежать образования среды, которая может оказать вредное воздействие на экстрагируемые белки или затруднить их экстракцию.

9.1.3 Приготовление 50-мМ Трис-HCl буфера, pH 8,0

Помещают в мерную колбу емкостью 1 л (9.1.1.10) последовательно следующее:
- 7,9 г безводного Tris-HCl (9.1.1.7).
доводят до 1 л сверхчистой водой (9.1.1.1); уровень pH регулируется до 8 с помощью 1М раствора NaOH (9.1.1.9).

9.1.4 Приготовление растворы буфера 50 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl

Вводят в мерную колбу емкостью 1 л (9.1.1.10) последовательно следующие нгреденты:
- 7,9 г безводного Tris-HCl (9.1.1.7),
- 5,8 г безводного хлорида натрия (9.1.1.6),
- разбавляют до 1 л сверхчистой водой (9.1.1.1) и перемешивают.

9.1.5 Приготовление 100 мМ раствора хлорида натрия

- Вводят в мерную колбу объемом 1 л (9.1.1.10) последовательно следующие вещества:
- 5,8 г безводного хлорида натрия (9.1.1.6),
- разбавляют до 1 л сверхчистой водой (9.1.1.1) и перемешивают.

9.2 Проведение исследования

Виноград сортов Пино нуар или Шардоне собирается в период зрелости и замораживается при температуре -20 °C. Семена удаляются из замороженного винограда перед дроблением. 3 г винограда с семенами измельчают в 10 мл ацетатного буфера натрия (9.1.2), разбавленного до 50 мМ, pH 5, содержащего 0,25% Тритон X-100 (9.1.1.4). Нерастворимый материал удаляется центрифугированием (5 мин при 3000 г) (9.1.1.12). Супернатант (2 мл) затем замораживают на ночь при температуре -20 °C с целью осветления.

Затем экстракт центрифугируют при 10 000 г в течение 15 мин для удаления нерастворимого материала.
К надосадочной жидкости добавляют сульфат аммония (9.1.1.5) до концентрации 30%. Смесь перемешивают в течение 1 часа при температуре 4 °C, затем центрифугируют еще раз, как описано выше.
Сульфат аммония (9.1.1.5) снова добавляют к супернатанту до конечной концентрации 60%. Смесь перемешивают в течение 2 часов при температуре 4 °C, затем еще раз центрифугируют, как описано выше.
Белковый осадок собирают и повторно растворяют в 1 мл 50 мМ Трис-HCl буфера, pH 8,0 (9.1.3). Белки наносятся на колонку, содержащую сильную анионную смолу (5 x 30 см) (9.1.1.15). Колонка промывается буфером Tris-HCl, описанным выше. Затем хитиназу и тауматин-подобные белки экстрагируют буфером Tris-HCl, содержащим 100 мМ NaCl. Все фракции собирают, затем обессоливают на мембране с MWCO 10 кДа (9.1.1.17) с использованием 50 мМ Tris-HCl буфера, pH 8,0 (9.1.4.3). Затем обессоленные белковые фракции загружают на хроматографическую колонку низкого давления (9.1.1.18), содержащую анионную смолу (9.1.1.16). Элюирование осуществляется с 120 мл градиента NaCl (9.1.5) от 0 до 100 мМ с помощью градиентного насоса с использованием раствора A сверхчистой воды (9.1.1.1) и раствора B хлорида натрия, 100 мМ (9.1.5). Концентрации белка и соли оцениваются соответственно путем измерения поглощения при 280 нм и проводимости жидкостей, выходящих из колонки, с помощью детекторов (9.1.1.19 и 9.1.1.20). Очищенные и выделенные таким образом фракции хитиназы и тауматинподобного белка используются для производства антител.

9.3 Получение антихитиназных и тауматиноподобных поликлональных антител кроликов

Используемый протокол идентичен описанному в Методе OIV-MA-AS315-12.

10. Библиография

1. **Anonymous.** 2004. "Determination of Plant Proteins in Wines and Musts," OIV, *Resolution Oeno 24/2004.* 1-7. (Method OIV-MA-AS315-12).

2. **Derckel, J. P.; Audran, J. C.; Haye, B.; Lambert, B. and Legendre, L.** 1998. "Characterization, Induction by Wounding and Salicylic Acid, and Activity against *Botrytis cinerea* of Chitinases and Beta-1,3-Glucanases of Ripening Grape Berries." *Physiologia Plantarum*, 104 (1), 56-64.
3. **Manteau, S.; Lambert, B.; Jeandet, P. and Legendre, L.** 2003. "Changes in Chitinase and Thaumatin-Like Pathogenesis-Related Proteins of Grape Berries During the Champagne Winemaking Process." *American Journal of Enology and Viticulture*, 54 (4), 267-72.
4. **Manteau, S. and Poinsaut, P.** 2010. "Instabilité Protéique Des Vins Blancs Et Rosés. Partie 2/2: Comparaison Des Tests De Stabilité Protéique Dans Les Vins Blancs Et Rosés Et Mise Au Point D'un Nouveau Test: L'immunoTest, 135, 23-27.
5. **Manteau, S.; Sauvage, F.-X.; Poinsaut, P.; Scotti, B.; Sieczkowski, N. and Moutounet, M.** 2006. "Haze in White Wine: Involvement of Proteins Other Than Pathogenesis-Related Proteins in Spontaneous Haze," Eds. P. Jeandet, C. Clement and A. Conreux, *Macrowine: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grape and Wine.* Reims: Intercept Publishers - Lavoisier, 165-68.
6. **Ribéreau-Gayon, J. and Peynaud, E.** 1961. "Précipitation Des Protéines," *Traité d'Oenologie. Tome II - Composition, Transformations Et Traitements Des Vins.* Librairie Polytechnique Ch. Béranger, 346-356.
7. **Waters, E.; Hayasaka, Y.; Tattersall, D.; Adams, K. and Williams, P.** 1998. "Sequence Analysis of Grape (*Vitis Vinifera*) Berry Chitinases That Cause Haze Formation in Wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (12), 4950-57.

Метод OIV-MA-AS315-30 Метод IV типа

Определение алкилфенолов в винах методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ-МС или ГХ-МС/МС)

(Резолюция Oeno 620/2020)

1. Область применения

Приведенный ниже метод позволяет определить следующие молекулы:

	Исследуемый диапазон
2-терт-бутилфенол	1-100 мг/л
4-терт-бутилфенол	1-100 мг/л
6-метил-2-терт-бутилфенол	1-100 мг/л
4-метил-2-терт-бутилфенол	1-100 мг/л
5-метил-2-терт-бутилфенол	1-100 мг/л
4,6- ди-метил-2-терт-бутилфенол	1-100 мг/л
2,6- ди-метил-2-терт-бутилфенол	1-100 мг/л
2,4- ди-метил-2-терт-бутилфенол	1-100 мг/л

2. Нормативные ссылки

- ISO 78-2: Химия - Структура стандартов,
- ISO 3696: Вода для лабораторного анализа. Технические условия,
- Резолюция OIV-OENO 418-2013.

3. Сущность метода

Метод описывает анализ, с одной стороны, с помощью газовой хроматографии, связанной с масс-спектрометрией (ГХ-МС), а с другой – газовой хроматографией, связанной с тандемной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС). Образец извлекается в твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ).

4. Реактивы и рабочие растворы

При проведении анализа – если не указано иное – должны использоваться только качественные, сертифицированные аналитические реагенты и дистиллированная или деминерализованная вода, или вода эквивалентной чистоты.

4.1.
Реактивы

4.1.1. Вода качества I или II для аналитического использования (стандарт ISO 3696)
4.1.2. Абсолютный этанол (CAS № 64-17-5)
4.1.3. Хлорид натрия (CAS № 7647-14-5)
4.1.4. 4-терт-бутилфенол-d13 (CAS № 225386-58-3)
4.1.5. 4-терт-бутилфенол (CAS № 98-54-4)
4.1.6. 2-терт-бутилфенол (CAS № 88-18-6)
4.1.7. 4-метил-2-терт-бутилфенол (CAS № 2409-55-4)
4.1.8. 5-метил-2-терт-бутилфенол (CAS № 88-60-8)
4.1.9. 6-метил-2-трет-бутилфенол (CAS № 2219-82-1)
4.1.10. 4,6-ди-метил-2-терт-бутилфенол (CAS № 1879-09-0)
4.1.11. 2,4-ди-терт-бутилфенол (CAS № 96-76-4)
4.1.12. 2,6-ди-терт-бутилфенол (CAS № 128-39-2)

4.2. Стоковые растворы

Для каждого алкилфенола, а также для внутреннего стандарта (например, 4-трет-бутилфенола-d13) в этаноле готовят индивидуальные исходные растворы в концентрации 1 г/л.

На основе индивидуальных исходных растворов готовят рабочие растворы в этаноле до нужных концентраций, чтобы охватить весь диапазон измерений.

4.3 Калибровочные растворы

Чтобы обеспечить наилучшую прослеживаемость в Международной системе единиц (СИ), калибровочный диапазон должен состоять из растворов и порошков с (высокой степенью) чистоты различных алкилфенолов, приготовленных по весу или объему в соответствии с СИ.

Калибровочный диапазон проводят с 12% (об./об.) этанолом (4.1.2), с диапазоном измерения (1-100 мкг/л$^{-1}$), охватывающим, например, 5 точек. Эти растворы готовятся во время анализа для немедленного использования после приготовления (в течение нескольких часов).
Полученное калибровочное уравнение обычно представляет собой квадратичную функцию.

5. Аппаратура

5.1. ГХ-МС, оснащенная инжектором для ввода проб с делением/без деления потока и масс-спектрометрическим детектором или тандемным масс-спектрометром
5.2. Капиллярная колонка с аполярной неподвижной фазой, 5% фенилметилполисилоксан (например, 5MC, 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм пленка) или эквивалент
5.3. Калиброванные 100-мкл, 1-мл и 10-мл микропипетки
5.4. 20-мл виала для ТФМЭ, герметично закрывающаяся перфорированной крышкой и тефлоновым уплотнением
5.5. Система твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) с волокном толщиной 100 мкм, покрытым полидиметилсилоксановой пленкой, или эквивалент
5.6. Весы с точностью 0,1 мг (СИ).
5.7. Измерительная стеклянная тара

Мерная стеклянная тара для приготовления реактивов и калибровочных растворов относится к классу A.

6. Подготовка проб

В качестве примера здесь используется внутренний стандарт 4-терт-бутилфенол-d13; возможно использование других внутренних стандартов.

Образец вина объемом 10 мл помещают в стеклянную колбу для ТФМЭ объемом 20 мл (5.4) с примерно 2 г NaCl (4.1.3) и 50 мкл раствора 4-трет-бутилфенола-d13 (внутренний стандарт) в концентрации 5 мг/л (4.1.4).
Пробирку закрывают перфорированной крышкой с тефлоновым уплотнением (5.4).

7. Проведение исследования ГХ-МС

Процедура приведена в качестве примера. Используемая методика ГХ-МС позволяет вносить необходимые изменения или оптимизацию в зависимости от конфигурации оборудования.

7.1. Экстракция
ТФМЭ в пробирке проводится в течение 20 минут при температуре 40 °C.
7.2. Инжекция
Десорбция из волокна проводится в течение 10 минут в инжекторе. Инжектор при температуре 260 °C в режиме без разделения
Скорость потока гелия: 1 мл/мин
7.3 Параметры газовой хроматографии
Колонка: 5MC UI 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм
Температура линии передачи: 300 °C
Печь: 50 °C
Далее 10 °C/мин до 300 °C

Время работы: 28,0 минут

7.4 Сбор данных
Температура источника: 250 °C
Quad температура: 150 °C
Сбор данных: выборочный мониторинг заданных ионов (SIM)

	Время выполнения (мин)	Ионы (количественный анализ)	Ионы (качественный анализ)
2- терт-бутилфенол	8.9	135	107-150
4- терт-бутилфенол-d13 (IS)	9.1	145	113-163
4- терт-бутилфенол	9.2	135	107-150
6- метил-2-терт-бутилфенол	9.4	149	164-121
4- метил-2-терт-бутилфенол	10.0	149	164-121
5- метил-2-терт-бутилфенол	10.2	149	164-121
4,6- диметил-2-терт-	10.5	163	135-178
2,6- ди-терт-бутилфенол	11.2	191	206-192
2,4- ди-терт-бутилфенол	12.0	191	206-192

Таблица 1: Ионы, используемые в масс-спектрометрии.

8. Проведение исследования ГХ-МС/МС

Процедура приведена в качестве примера. Используемая методика ГХ-МС/МС позволяет вносить необходимые изменения или оптимизацию в зависимости от конфигурации оборудования.

8.1. Экстракция
ТФМЭ проводится в течение 5 минут при 40 °C.

8.2. Инжекция
Десорбция из волокна проводится в течение 8 минут в инжекторе. Инжектор при 250 °C в режиме импульсного разделения с коэффициентом разделения 2:1.
Скорость потока гелия: 2 мл/мин

8.3. Параметры газовой хроматографии
Колонка: 5MS UI 30 m × 0,25 мм × 0,25 мкм или эквивалент
Линия передачи: 300 °C
Печь: 50 °C
Далее 25 °C/мин до 130 °C
Далее 10 °C/мин до 170 °C
Далее 25 °C/мин до 300 °C
Далее 300 °C в течение 3 минут
Время работы: 15,4 минуты

8.4. Сбор данных
Температура источника: 250 °C

Quad Температура: 150 °C
Сбор данных: селективная регистрация избранных реакций распада нескольких ионов (MRM)

	Время выполнения (мин)	Количественные переходы	Качественные переходы
2-терт-бутилфенол	5.0	135>107	150>107 и 150>135
4-терт-бутилфенол-d13 (IS)	5.1	145>113	163>113 и 163>145
4-терт-бутилфенол	5.2	135>107	150>107 и 150>135
6-метил-2-терт-бутилфенол	5.3	149>121	164>121 и 164>149
4- метил-2-терт-бутилфенол	5.7	149>121	164>121 и 164>149
5- метил-2-терт-бутилфенол	5.8	149>121	164>121 и 164>149
4,6- диметил-2-терт-бутилфенол	6.1	163>135	178>135 и 178>163
2,6- ди-терт-бутилфенол	6.6	206>191	191>163 и 191>57
2,4- ди-терт-бутилфенол	7.2	191>57	191>163 и 206>191

Таблица 2: Ионы, используемые в тандемной масс-спектрометрии.

9. Выражение результатов

Результаты выражаются в мкг/л.

10. Приложение 1: Результаты внутренней валидации

Производительность измерялась с помощью внутрилабораторного экспериментального подхода: 5 материалов, охватывающих область применения метода (1; 5; 25; 50; 100 мкг/л), были составлены по рецептуре смесей в матрице синтетического вина (гидроспиртовой раствор 12% (об./об.), 6 г/л винной кислоты, корректировка уровня pH до 3,5 с помощью 1M NaOH).

Каждый материал был проанализирован 5 раз в условиях промежуточной точности с 2 повторениями каждого анализа. Анализы проводились в сентябре и октябре 2018 года.

Расчеты проводились в соответствии с Резолюцией OIV-OENO 418-2013 "Практическое руководство по оценке, контролю качества и анализу неопределенности метода энологического анализа".

ГХ-МС	% CV (k=2) Промежуточная точность	CVr (%) Повторяемость	Валидированный LOQ
2- терт-бутилфенол	6.7%	4.3%	1 мг/л
4- терт-бутилфенол	7.3%	5.1%	1 мг/л
6- метил-2 - терт-бутилфенол	12.1%	10.2%	1 мг/л
4- метил-2-терт-бутилфенол	6.0%	4.6%	1 мг/л
5- метил-2-терт-бутилфенол	6.4%	4.9%	1 мг/л
4,6- диметил-2-терт-бутилфенол	12.7%	10.5%	1 мг/л
2,6- ди-терт-бутилфенол	19.5%	14.6%	1 мг/л
2,4- ди-терт-бутилфенол	11.9%	9.9%	1 мг/л

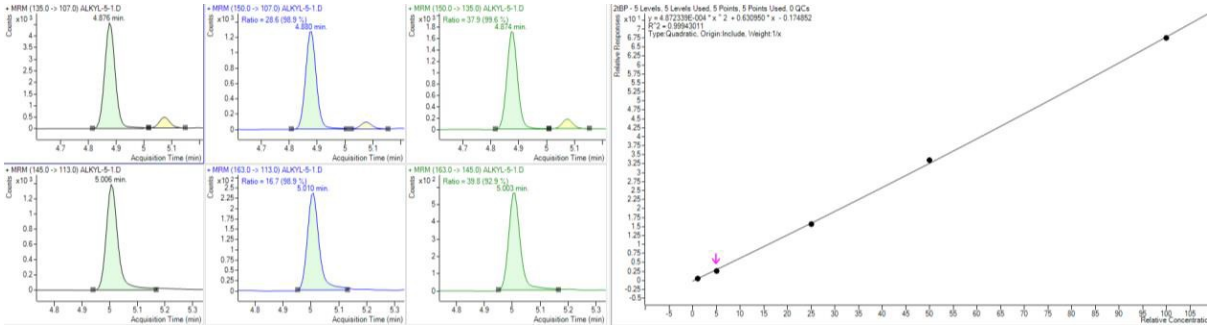
Таблица 3: Показатели, полученные с помощью масс-спектрометрии.

ГХ-МС/МС	% CV (k=2) Промежуточная точность	CVr (%) Повторяемость	LOQ
2- терт-бутилфенол	11.3%	10.1%	1 мг/л
4-терт-бутилфенол	10.4%	11.0%	1 мг/л
6- метил-2-терт-бутилфенол	13.9%	13.5%	1 мг/л
4- метил-2-терт-бутилфенол	11.1%	9.6%	1 мг/л
5- метил-2-терт-бутилфенол	12.3%	10.3%	1 мг/л
4,6- диметил-2-терт-бутилфенол	13.4%	12.6%	1 мг/л
2,6- ди-терт-бутилфенол	16.6%	16.8%	1 мг/л
2,4- ди-терт-бутилфенол	14.5%	12.4%	1 мг/л

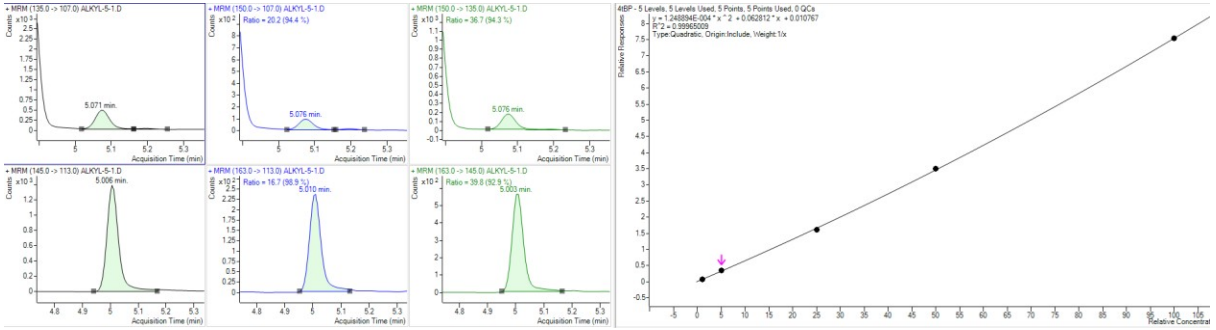
Таблица 4: Показатели, полученные с помощью тандемной масс-спектрометрии.

11. Приложение 2: Примеры хроматограмм и калибровочных кривых

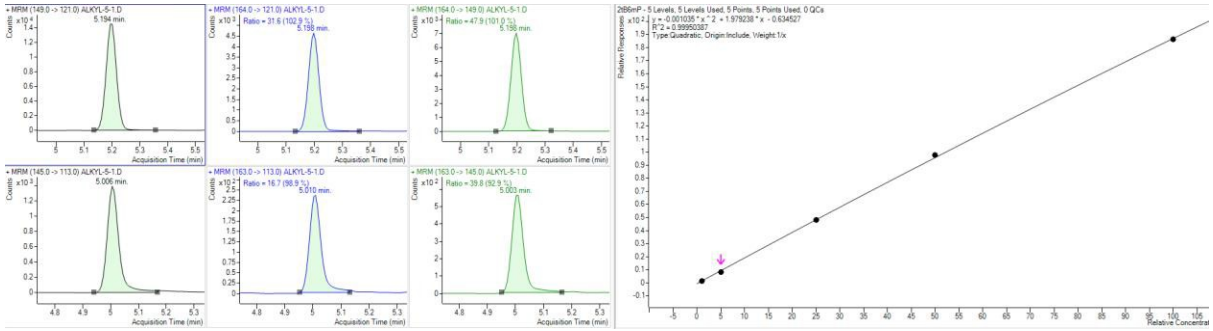
11.1 2- трет-бутилфенол



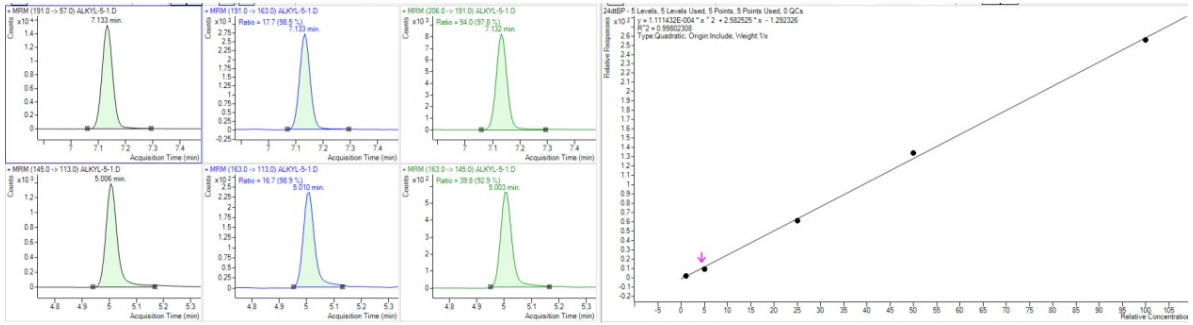
11.2 4- трет-бутилфенол



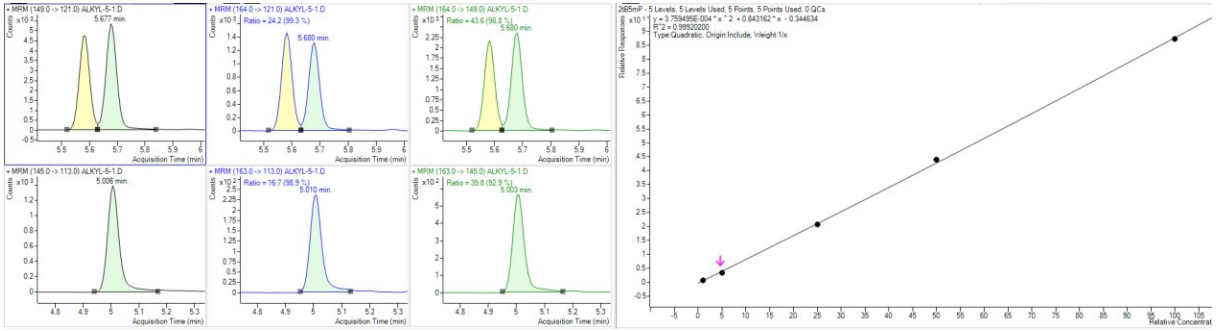
11.3 6-метил-2- трет-бутилфенол



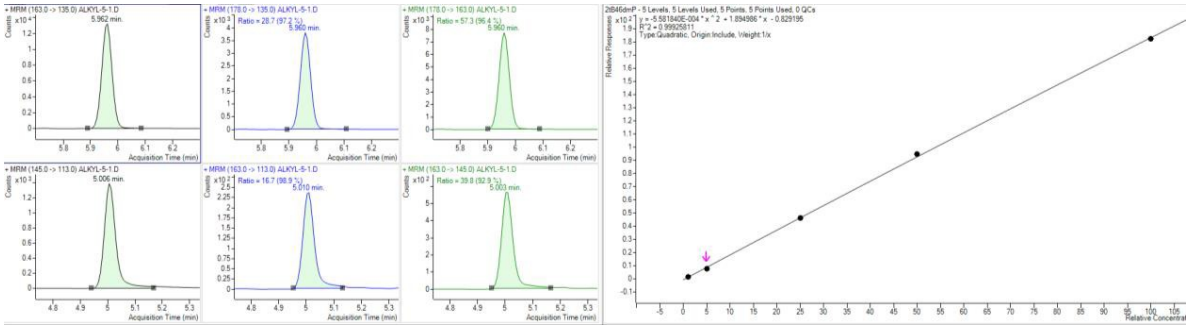
11.4 4- метил -2- трет-бутилфенол



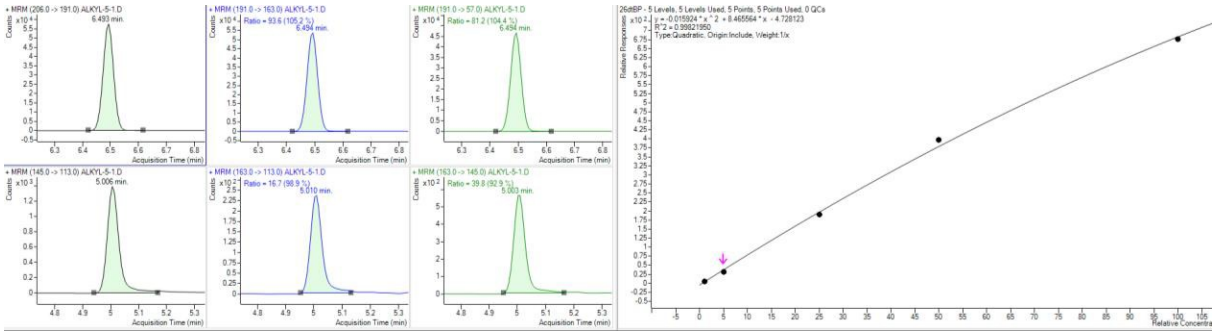
11.5 5- метил -2- трет-бутилфенол



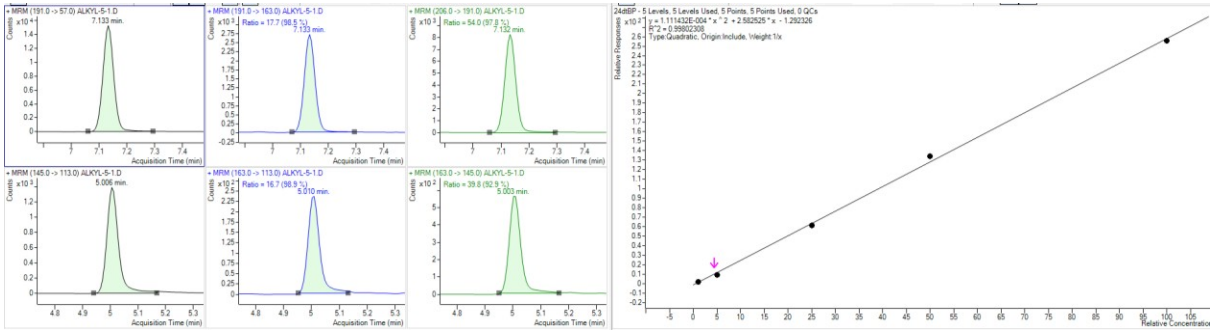
11.6 4,6- диметил-2- трет-бутилфенол



11.7 2,6-ди-трет-бутилфенол



11.8 2,4-ди-трет-бутилфенол



Метод OIV-MA-AS315-31 Тип метода: IV

Качественное определение подсластителей в вине методом жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометрией (ЖХ-МС)

(Резолюция OIV-OENO 636-2021)

1. Область применения

Данный метод подходит для определения наличия пяти искусственных подсластителей (аспартам, ацесульфам калия, цикламат натрия, сахарин и сукралоза), а также натурального подсластителя стевиозида в белом, розовом и красном вине.

2. Терминология и аббревиатура

ESI – Электрораспылительная ионизация

ЖХ – Жидкостная хроматография

ЖХ-МС – Жидкостная хроматография, соединенная с масс-спектрометрией

m/z – Отношение массы к заряду

МС – Масс-спектрометрия

MS/MS – Режим получения масс-спектрометрии с измерением ионов продуктов

QTOF – Квадрупольная времяпролетная масс-спектрометрия

RP – Обратная фаза

RT – Время удерживания

УВЭЖХ – Сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

3. Сущность метода

Непосредственный анализ вина проводится с помощью системы жидкостной хроматографии, соединенной с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). В жидкостной хроматографии (ЖХ) разделение осуществляется с помощью колонки с обращенной фазой (RP), а обнаружение производится с помощью масс-спектрометрии (МС) в соответствии с соотношением массы и заряда (m/z) соединений. Данные МС в сочетании со временем удерживания (RT) используются для идентификации и количественного определения подсластителей.

4. Реактивы и материалы

4.1. Реактивы:

4.1.1. Ацетонитрил, чистота ≥ 99,95 % (CAS № 75-05-8)
4.1.2. Очищенная вода: 18 М Ом-см, ТОС ≤ мкг/л.
4.1.3. Муравьиная кислота, чистота ≥ 98 % (CAS № 64-18-6)
4.1.4. Аспартам, чистота ≥ 99,0 % (CAS № 22839-47-0)
4.1.5. Ацесульфам К, чистота ≥ 99,9 % (CAS № 55589-62-3)
4.1.6. Цикламат натрия, чистота ≥ 99,8 % (CAS № 139-05-9)
4.1.7. Сахарин, чистота ≥ 99 % (CAS № 81-07-2)
4.1.8. Сукралоза, чистота ≥ 98,0 % (CAS № 56038-13-2)
4.1.9. Стевиозид, чистота ≥ 95,0 % (CAS № 57817-89-7)
4.1.10. Вина, репрезентативные для рабочих матриц и предварительно проверенные на отсутствие каких-либо подсластителей для использования при приготовлении калибровочных растворов и стандартов.

4.2. Приготовление растворов (в качестве примера)

Стандарты и калибровочные растворы хранятся в холодильнике при температуре 6 °C. Растворы аспартама нестабильны в кислой среде. Поэтому при каждом анализе стандарта их необходимо готовить заново.

4.2.1. Стандартные растворы

Индивидуальные стандартные растворы с концентрацией 1 г/л готовятся, например, путем растворения 10,0 мг каждого подсластителя в волюметрических колбах объемом 10 мл и заполнения до метки водой (4.1.2) или раствором этанола 12% об./об.

4.2.2. Калибровочные стандарты

Калибровочные стандарты готовятся и анализируются методом ЖХ-МС, как и любой другой образец (см. 6).

Калибровочные стандарты готовятся в вине (4.1.10) путем разбавления соответствующего количества стандартного раствора (4.2.1) для получения концентраций 50 мкг/л, 100 мкг/л, 500 мкг/л и 1000 мкг/л каждого подсластителя.
При необходимости улучшения характеристик метода рекомендуется проводить калибровку с использованием той же оцениваемой матрицы.

5. Аппаратура

5.1. Шприцевые фильтры: Полипропиленовая мембрана 0,2 мкм, диаметр 25 мм.
5.2. Лабораторная стеклянная тара, а именно волюметрические колбы класса А.
5.3. Аналитические весы с разрешением ±0,0001 г.
5.4. Микропипетки для объемов от 5 мкл до 1000 мкл.
5.5. Прибор для высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометром.
5.5.1. Возможно использование стандартных систем ВЭЖХ и СВЭЖХ при условии соответствующей настройки хроматографического разделения.
5.5.2 Возможно несколько конфигураций масс-спектрометра, таких как квадрупольный, ионная ловушка, времяпролетный, а также гибридные системы.

6. Отбор проб

Каждый образец вина перед впрыскиванием подготавливается путем фильтрации с помощью шприцевого фильтра (5.1).

При необходимости образцы предварительно дегазируются, например, с помощью ультразвуковой ванны или продувки азотом. Если концентрация выходит за пределы калибровочного диапазона, образцы следует разбавить.

Лучших показателей можно также добиться с помощью дополнительных этапов подготовки пробы, таких как разбавление (в зависимости от чувствительности прибора), очистка пробы и экстракция.

7. Проведение исследование

Следующее описание, приведенное в качестве примера, относится к прибору СВЭЖХ-QTOF, оснащенному источником ESI. Возможны изменения в зависимости от типа оборудования или инструкции производителя.

7.1. ЖХ-анализ:

- Подвижная фаза A: очищенная вода (4.1.2) с 0,1 % муравьиной кислоты (4.1.3).
- Подвижная фаза B: ацетонитрил (4.1.1) с 0,1 % муравьиной кислоты (4.1.3)
- Объем впрыска: 2 мкл
- Температура пробоотборника: 10 °C
- Колонка: RP C8 2,1 мм x 100 мм, 1,9 мкм
- Температура колонки: 30 °C
- Градиент:

Время Мин	Расход мл/мин	% A	% B
0	0.4	90	10
3	0.4	60	40
3	0.4	1	99
4	0.4	1	99
4	0.8	1	99
5.5	0.8	1	99
5.5	0.5	90	10
9.5	0.5	90	10
9.5	0.4	90	10
10	0.4	90	10

7.2. Параметры масс-спектрометра:
- ESI: отрицательная ионизация
- Температура источника: 200 °C
- Капиллярное напряжение: 3000 В
- Режим сбора: широкополосная диссоциация, вызванная столкновениями (bbCID)
  - Состоит из попеременного получения спектров в режимах полного сканирования и MS/MS (получение ионов прекурсора и продукта соответственно).
- Энергия столкновения: 30 эВ
- Частота получения спектров: 2,0 Гц
- Поток сухого газа: 8 л/мин;
- Давление в распылителе: $2{,}0 \times 10^5$ Па (2,0 бар)

8. Идентификация

Идентификация подсластителя подтверждается с помощью стандарта для каждого соединения (4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, 4.1.8 и 4.1.9). Данные, собранные для подтверждения пика, представляют собой RT для наведения (они могут варьироваться в зависимости от хроматографических параметров) и m/z ионов предшественника и продукта (Таблица 1).

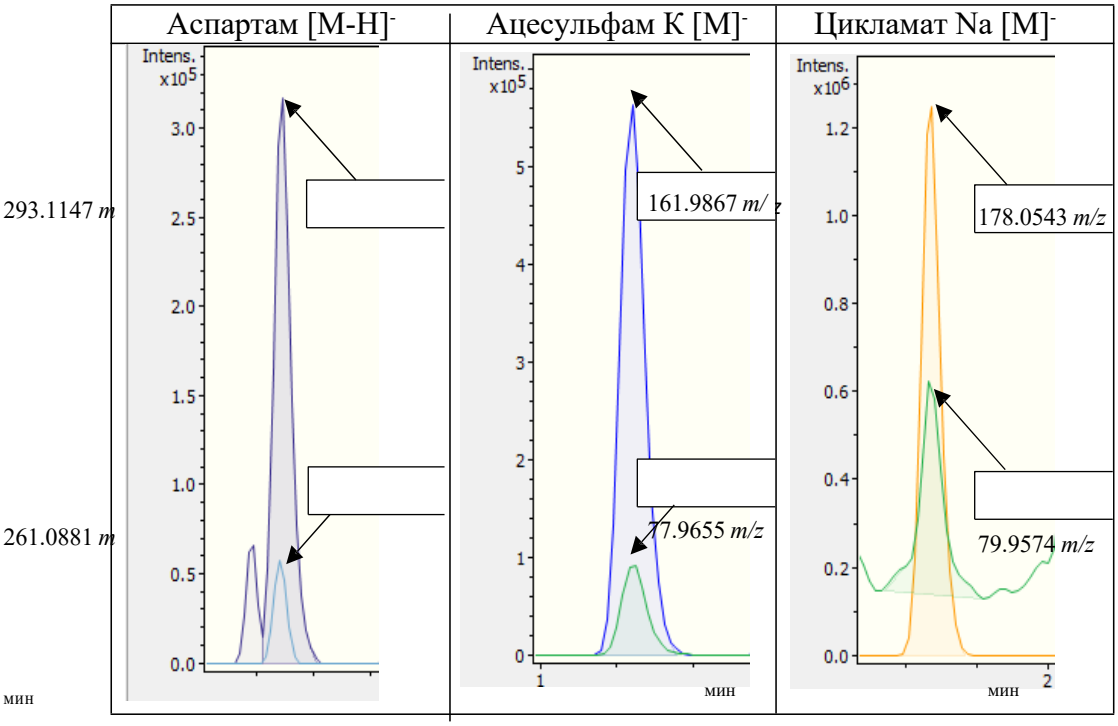
Таблица 1 - Данные идентификации подсластителей: RT, m/z прекурсора и m/z продукта

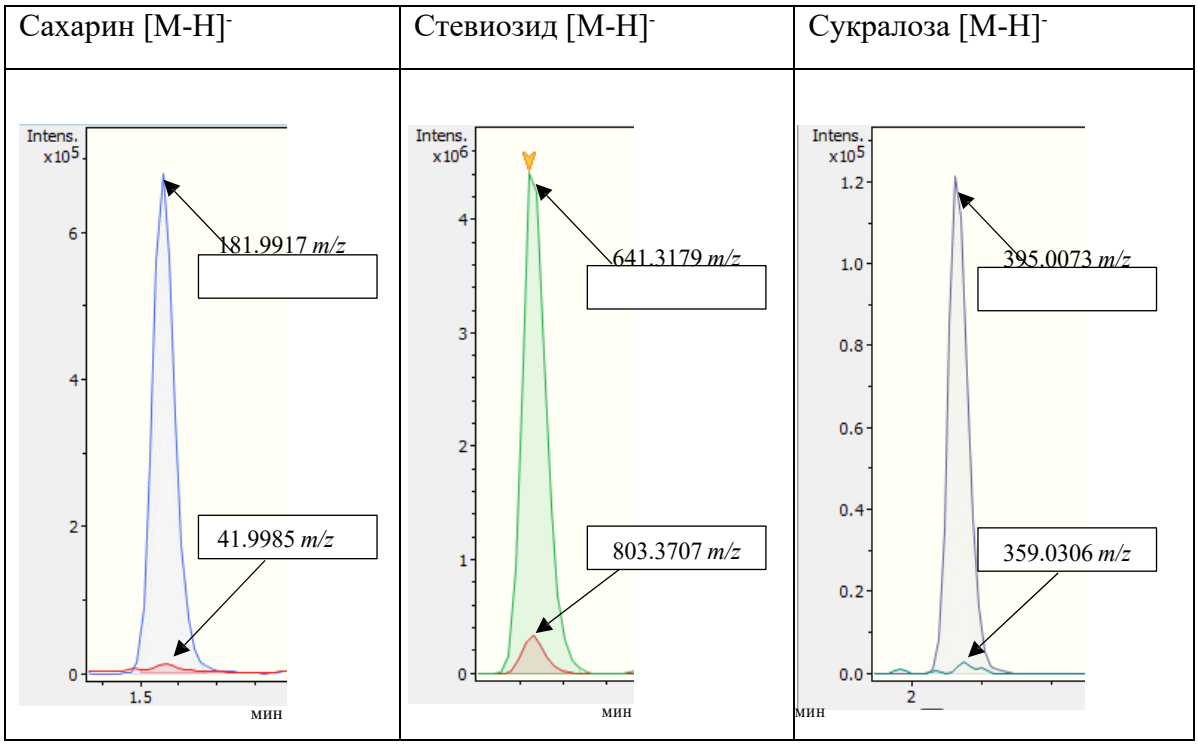
Подсластитель	**RT мин**	**Ио**	**Прекурсор**	**Продукт *m/z***
Ацесульфам К	1.24	$[M]^-$	161.9867	77.9655
Аспартам	2.30	$[M-H]^-$	293.1143	261.0881
Цикламат Na	1.66	$[M]^-$	178.0543	79.9574
Сахарин	1.55	$[M-H]^-$	181.9917	41.9985
Сукралоза	2.14	$[M-H]^-$	395.0073	359.0306
Стевиозид	3.63	$[M-H]^-$	803.3707	641.3026

Примечание: Ионы, используемые для количественного определения, отмечены в таблице 1.

Сигналы ионов контролируются с помощью хроматограмм извлеченных ионов с допуском ±3 мДа (рис. 1).

Рисунок 1 - Подтверждение пиков прекурсоров и продуктов для стандартного образца 250 мкг/л





Примечание: Пример низкой чувствительности стандарта и дополнительные переходы приведены в приложении.

9. Расчеты

Результаты рассчитываются по калибровочной кривой, которая получается при соотношении количества (мкг/л) к площади пика каждого подсластителя:

$$C = \frac{\mathrm{A}_s - Int}{S}$$

Где C - концентрация подсластителя (мкг/л), As - площадь пика образца, Int - точка пересечения оси Y калибровочной линии и S - наклон калибровочной линии.

10. Результаы

Концентрации выражены в мкг/л без десятичных знаков.

11. Внутренняя валидация

11.1. Матрицы

Валидация была проведена с использованием в общей сложности 43 различных вин: 20 красных вин, 10 розовых вин и 13 белых вин. Эти вина были отобраны из нескольких регионов с целью получения большой вариативности характеристик для комплексного подхода. Ниже приведена таблица с основными характеристиками вин.

Таблица 2 - Основные характеристики матриц

	Красное вино (К)		Розовое вино (Р)		Белое вино (Б)	
Регионы	Алентежу	4	Дору	3	Асорес	1
	Байррада	1	Виньо Верде	1	Алентежу	2
	Дао	3	Прочее (1)	6	Дао	1
	Дору	4			Дору	1
	Лисбоа	1			Лисбоа	1
	Вальядолид	1			Виньо Верде	4
	Прочее(1)	6			Прочее (1)	3

Крепость алкоголя по объему % об./об.	12.1 – 17.2	9.8 – 12.6	8.7 – 13.6
держание сахара г/л (глюкоза + фруктоза)	0.5 – 108.0	0.7 – 28.8	0.2 – 17.1
Общая кислотность г/л (винная кислота)	4.6 – 6.4	4.7 – 6.0	5.2 – 7.1
pH	3.5 – 3.8	3.2 – 3.5	3.2 – 3.4
Интенсивность	2.4 – 16.2	0.1 – 0.5	0.03 – 0.29(2)

(1) Без географического указания
(2) Абсорбция при 420 нм вместо интенсивности

11.2. Линейность

Метод является линейным в диапазоне концентраций от 50 мкг/л и 1000 мкг/л

11.3. Калибровка

Всего было проведено 14 независимых калибровок: 6 красных вин, 4 розовых вин и 4 белых вин. Затем для каждого состава были проведены калибровки с использованием трех различных подходов:

- Одна единая калибровка для всех матриц
- 2 группы матриц, состоящие из одной группы для белых вин и другой группы с остальными винами (красные и розовые вина
- 3 группы матриц, состоящих из белых, розовых и красных вин.

Здесь представлены оптимизированные результаты валидационного исследования. В соответствии с выбранными условиями калибровки, для ацесульфама, сахарина и сукралозы калибровочные функции и последующие расчеты были выполнены с учетом первой группы для белых вин и второй группы для остальных матриц, красных и розовых вин.

Для аспартама, цикламата и стевиозида были рассмотрены три группы матриц: красные, розовые и белые вина.

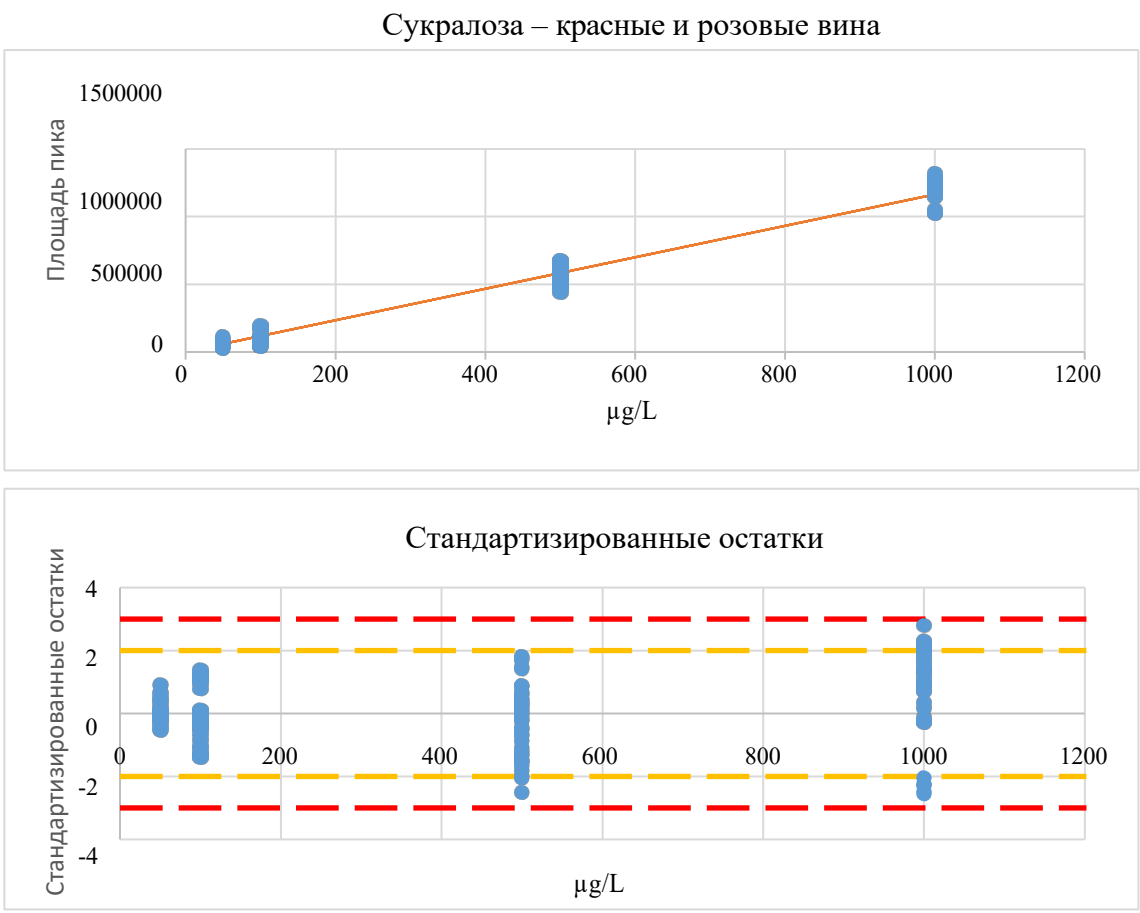
Таблица 3 - Схема калибровки для каждого вещества

Калибровки	Отдельные			Смешанные
	Белое вино	Розовое вино	Красное вино	Красные вина + Розовые вина
Матрицы	X			X
Ацесульфам	X	X	X	
Аспартам	X	X	X	
Цикламат	X			X
Сахарин	X	X	X	
Стевиозид	X			X

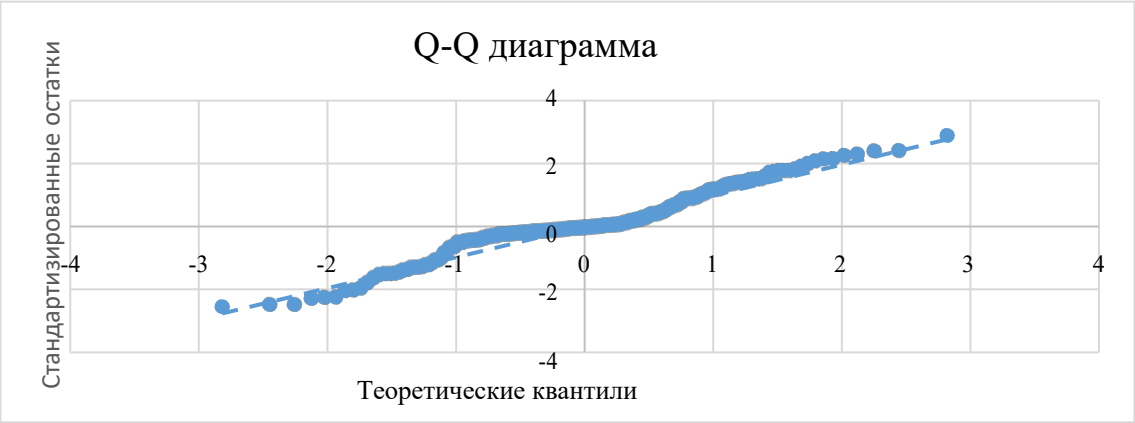
Учитывая гетероскедастичность и нормальное распределение остатков, в качестве используемой регрессионной модели была применена взвешенная регрессия по методу наименьших квадратов.

В качестве примера ниже представлена сукралоза для группы красных и розовых вин в диапазоне концентраций от 50 мкг/л до 1000 мкг/л.

Рисунок 2 - Калибровочная кривая, стандартизированные остатки и график Q-Q для комбинированной калибровки красных и розовых вин на содержание сукралозы



желтый	2-кратное	стандартное
красны	3-кратное	стандартное



11.4. Пределы обнаружения и пределы количественного определения
Пределы количественного определения были получены путем расчета по калибровочным графикам

Таблица 4 – значения LOD и LOQ, полученные для каждого соединения

	LOD (мг/л)			**LOQ (мг/л)**		
	Белое вино	Розовое вино	Красное вино	Белое вино	Розовое вино	Красное вино
Ацесульфам К	0.003	0.003		0.011	0.011	
Аспартам	0.004	0.006	0.004	0.014	0.019	0.014
Цикламат Na	0.002	0.005	0.004	0.006	0.015	0.014
Сахарин	0.002	0.005		0.006	0.016	
Стевиозид	0.002	0.002	0.005	0.005	0.005	0.016

Сукралоза	0.014	0.007	0.048	0.022

11.5. Повторяемость

Повторяемость оценивалась на трех уровнях добавок: 50 мкг/л, что соответствует предельному уровню, 250 мкг/л и 1000 мкг/л. Эта оценка основана на 8 повторных вводах добавок на каждом уровне и для каждой матрицы.

В следующих таблицах представлены значения повторяемости, полученные для каждого подсластителя, включая среднюю концентрацию, измеренную в каждом образце, стандартное отклонение (Std. Dev.), процентное относительное стандартное отклонение для повторяемости (RSDr %) и коэффициент Горвица для повторяемости (HorRat (r)).

Таблица 5 - Значения повторяемости для ацесульфама калия при 3 уровнях навески

Ацесульфам	Белое вино (Б)								
Образец	Б1	Б2	Б3	Б4	Б5	Б6	Б7	Б8	Б9
Средн. мкг/л	45	42	49	233	207	240	1036	926	1060
Ст. откл.	1.4	2.1	0.8	3.3	5.2	2.6	13.2	13.7	15.8
Восстановление %	89 %	84 %	98 %	93 %	83 %	96 %	104 %	93 %	106 %
RSDr %	3.2 %	5.0 %	1.6 %	1.4 %	2.5 %	1.1 %	1.3 %	1.5 %	1.5 %
HorRat (r)	0.13	0.20	0.06	0.07	0.13	0.05	0.08	0.09	0.09

Ацесульфам	Розовое вино (Р)								
Образец	Р 1	Р 2	Р 3	Р 4	Р5	Р6	Р7	Р8	Р9
Средн. мкг/л	49	52	53	248	248	247	1063	1091	1097
Ст. откл.	2.0	1.2	1.4	2.9	3.5	3.9	14.1	13.2	15.5
Восстановление %	98 %	104 %	107 %	99 %	99 %	99 %	106 %	109 %	110 %
RSDr %	4.1 %	2.3 %	2.6 %	1.2 %	1.4 %	1.6 %	1.3 %	1.2 %	1.4 %
HorRat (r)	0.17	0.09	0.10	0.06	0.07	0.08	0.08	0.08	0.09

Ацесульфам	Красное вино (К)								
Образец	К1	К2	К3	К4	К5	К6	К7	К8	К9
Средн. мкг/л	56	50	57	275	241	260	1195	1064	1160
Ст. откл.	1.2	2.0	1.4	3.2	5.1	4.3	13.8	14.5	10.0
Восстановление %	112 %	101 %	115 %	110 %	96 %	104 %	120 %	106 %	116 %
RSDr %	2.1 %	3.9 %	2.4 %	1.2 %	2.1 %	1.6 %	1.2 %	1.4 %	0.9 %
HorRat (r)	0.08	0.16	0.10	0.06	0.11	0.08	0.07	0.09	0.05

Таблица 6 - Значения повторяемости аспартама на 3 уровнях повышения

Аспартам	Белое вино (Б)								
Образец	Б1	Б2	Б3	Б4	Б5	Б6	Б7	Б8	Б9
Средн. мкг/л	34	51	45	237	231	235	981	973	982
Ст. откл.	7.3	4.2	6.7	27.5	7.6	10.9	29.0	18.0	23.2

Восстановление %	68 %	101 %	91 %	95 %	92 %	94 %	98 %	97 %	98 %
RSDr %	21.6 %	8.3 %	14.7 %	11.6 %	3.3 %	4.6 %	3.0 %	1.8 %	2.4 %
HorRat (r)	0.87	0.33	0.59	0.59	0.17	0.24	0.19	0.12	0.15

Аспартам	Розовое вино (Р)								
Образец	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Средн. мкг/л	38	42	41	200	211	210	833	905	916
Ст. откл.	3.0	2.9	4.3	6.8	5.2	5.9	20.9	34.0	22.5
Восстановление %	75 %	85 %	82 %	80 %	84 %	84 %	83 %	90 %	92 %
RSDr %	8.0 %	6.9 %	10.6 %	3.4 %	2.5 %	2.8 %	2.5 %	3.8 %	2.5 %
HorRat (r)	0.32	0.28	0.43	0.17	0.13	0.14	0.16	0.24	0.15
Аспартам	Красное вино (К)								
Образец	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
Среднее мкг/л	46	51	50	227	254	230	956	1099	1013
Std. Dev.	8.6	3.2	8.1	16.9	10.4	7.3	21.8	39.0	20.2
Восстановление %	92 %	103 %	100 %	91 %	102 %	92 %	96 %	110 %	101 %
RSDr %	18.5 %	6.3 %	16.2 %	7.4 %	4.1 %	3.2 %	2.3 %	3.5 %	2.0 %
HorRat (r)	0.74	0.25	0.65	0.38	0.21	0.16	0.14	0.22	0.13

Таблица 7 - Значения повторяемости цикламата натрия на 3 уровнях повышения

Цикламат	Белое вино (Б)

Образец	Б1	Б2	Б3	Б4	Б5	Б6	Б7	Б8	Б9
Средн. мкг/л	51	50	50	261	247	246	1092	1040	1045
Ст. откл.	1.0	1.4	1.4	2.8	4.2	3.5	12.2	17.7	14.4
Восстановление %	103 %	100 %	101 %	104 %	99 %	99 %	109 %	104 %	105 %
RSDr %	1.9 %	2.9 %	2.9 %	1.1 %	1.7 %	1.4 %	1.1 %	1.7 %	1.4 %
HorRat (r)	0.08	0.12	0.11	0.05	0.09	0.07	0.07	0.11	0.09

Цикламат	Розовое вино (Р)								
Образец	Р1	Р2	Р3	Р4	Р5	Р6	Р7	Р8	Р9
Средн. мкг/л	42	42	44	232	228	233	982	992	1002
Ст. откл.	1.6	1.3	0.8	2.8	4.4	4.5	14.9	6.0	12.9
Восстановление %	84 %	85 %	88 %	93 %	91 %	93 %	98 %	99 %	100 %
RSDr %	3.9 %	3.0 %	1.7 %	1.2 %	2.0 %	1.9 %	1.5 %	0.6 %	1.3 %
HorRat (r)	0.16	0.12	0.07	0.06	0.10	0.10	0.10	0.04	0.08

Цикламат	Красное вино (К)								
Образец	К1	К2	К3	К4	К5	К6	К7	К8	К9
Средн. мкг/л	51	55	54	250	265	243	1069	1160	1086
Ст. откл.	1.2	1.3	1.4	5.5	5.2	4.2	27.4	13.9	18.4
Восстановление %	103 %	110 %	108 %	100 %	106 %	97 %	107 %	116 %	109 %
RSDr %	2.4 %	2.4 %	2.6 %	2.2 %	2.0 %	1.7 %	2.6 %	1.2 %	1.7 %

HorRat (r)	0.10	0.10	0.10	0.11	0.10	0.09	0.16	0.08	0.11

Таблица 8 - Значения повторяемости для сахарина на 3 уровнях повышения

Сахарин	Белое вино (Б)								
Образец	Б1	Б2	Б3	Б4	Б5	Б6	Б7	Б8	Б9
Средн. мкг/л	45	45	59	216	214	252	920	909	1055
Ст. откл.	1.5	1.4	1.4	5.1	5.1	3.7	21.3	23.7	21.5
Восстановление %	89 %	91 %	119 %	86 %	86 %	101 %	92 %	91 %	105 %
RSDr %	3.3 %	3.0 %	2.4 %	2.4 %	2.4 %	1.5 %	2.3 %	2.6 %	2.0 %
HorRat (r)	0.13	0.12	0.10	0.12	0.12	0.08	0.15	0.16	0.13

Сахарин	Розовое вино (Р)								
Образец	Р1	Р2	Р3	Р4	Р5	Р6	Р7	Р8	Р9
Средн. мкг/л	58	56	56	303	276	278	1263	1190	1204
Ст. откл.	1.4	2.0	0.6	5.5	3.5	4.8	28.8	24.8	25.2
Восстановление %	116 %	112 %	112 %	121 %	110 %	111 %	126 %	119 %	120 %
RSDr %	2.4 %	3.5 %	1.1 %	1.8 %	1.3 %	1.7 %	2.3 %	2.1 %	2.1 %
HorRat (r)	0.10	0.14	0.04	0.09	0.07	0.09	0.14	0.13	0.13
Сахарин	Красное вино (К)								

Образец	К1	К2	К3	К4	К5	К6	К7	К8	К9
Средн. мкг/л	47	44	46	224	203	199	955	906	885
Ст. откл.	1.4	0.5	1.5	4.4	2.2	2.9	20.6	20.1	25.8
Восстановление %	94 %	88 %	92 %	89 %	81 %	80 %	95 %	91 %	88 %
RSDr %	3.0 %	1.1 %	3.2 %	2.0 %	1.1 %	1.5 %	2.2 %	2.2 %	2.9 %
HorRat (r)	0.12	0.04	0.13	0.10	0.06	0.07	0.14	0.14	0.18

Таблица 9 - Значения повторяемости для стевиозида при 3 уровнях повышения

Стевиозид	Белое вино (Б)								
Образец	Б1	Б2	Б3	Б4	Б5	Б6	Б7	Б8	Б9
Средн. мкг/л	41	43	30	262	265	204	1094	1116	860
Ст. откл.	0.4	0.4	0.7	2.0	31.2	1.9	13.6	12.9	6.6
Восстановление %	83 %	86 %	60 %	105 %	106 %	81 %	109 %	112 %	86 %
RSDr %	1.0 %	1.0 %	2.2 %	0.8 %	11.8 %	0.9 %	1.2 %	1.2 %	0.8 %
HorRat (r)	0.04	0.04	0.09	0.04	0.60	0.05	0.08	0.07	0.05

Стевиозид	Розовое вино (Р)								
Образец	Р1	Р2	Р3	Р4	Р5	Р6	Р7	Р8	Р9
Средн. мкг/л	50	39	41	237	254	286	935.	1104	1109
Ст. откл.	0.8	1.3	0.9	2.6	5.3	7.1	10.5	10.2	18.3
Восстановление %	99 %	77 %	81 %	95 %	102 %	114 %	93 %	110 %	111 %

RSDr %	1.7 %	3.4 %	2.2 %	1.1 %	2.1 %	2.5 %	1.1 %	0.9 %	1.6 %
HorRat (r)	0.07	0.14	0.09	0.06	0.11	0.13	0.07	0.06	0.10

Стевиозид	Красное вино (К)								
Образец	К1	К2	К3	К4	К5	К6	К7	К8	К9
Средн. мкг/л	60	40	43	262	211	210	1048	904	921
Ст. откл.	0.9	0.7	0.4	4.0	4.0	2.6	18.0	18.4	11.9
Восстановление %	120 %	80 %	86 %	105 %	85 %	84 %	105 %	90 %	92 %
RSDr %	1.5 %	1.8 %	1.0 %	1.5 %	1.9 %	1.3 %	1.7 %	2.0 %	1.3 %
HorRat (r)	0.06	0.07	0.04	0.08	0.10	0.06	0.11	0.13	0.08

Таблица 10 - Значения повторяемости сукралозы на 3 уровнях повышения

Сукралоза	Белое вино (Б)								
Образец	Б1	Б2	Б3	Б4	Б5	Б6	Б7	Б8	Б9
Средн. мкг/л	53	52	53	221	225	223	986	973	1021
Ст. откл.	5.3	7.8	8.1	10.8	27.5	6.5	29.8	43.9	31.5
Восстановление %	106 %	103 %	105 %	88 %	90 %	89 %	99 %	97 %	102 %

RSDr %	10.0 %	15.1 %	15.4 %	4.9 %	12.2 %	2.9 %	3.0 %	4.5 %	3.1 %
HorRat (r)	0.40	0.61	0.62	0.25	0.63	0.15	0.19	0.28	0.19
Сукралоза	Красное вино (Р)								
Образец	Р1	Р2	Р3	Р4	Р5	Р6	Р7	Р8	Р9
Средн. мкг/л	35	43	36	215	236	194	944	1075	905
Ст. откл.	4.1	2.1	2.2	7.2	7.4	7.7	21.3	27.5	19.3
Восстановление %	70 %	86 %	71 %	86 %	94 %	78 %	94 %	108 %	91 %
RSDr %	11.7 %	5.0 %	6.2 %	3.3 %	3.1 %	4.0 %	2.3 %	2.6 %	2.1 %
HorRat (r)	0.47	0.20	0.25	0.17	0.16	0.20	0.14	0.16	0.13

Сукралоза	Красное вино (К)								
Образец	К1	К2	К3	К4	К5	К6	К7	К8	К9
Средн. мкг/л	50	46	48	236	255	228	1017	1194	1041
Ст. откл.	7.7	3.1	6.8	11.5	9.2	8.4	16.9	27.5	23.0
Восстановление %	100 %	92 %	96 %	94 %	102 %	91 %	102 %	119 %	104 %
RSDr %	15.3 %	6.9 %	14.1 %	4.9 %	3.6 %	3.7 %	1.7 %	2.3 %	2.2 %
HorRat (r)	0.61	0.28	0.57	0.25	0.18	0.19	0.10	0.15	0.14

Таблица 11 - Сводная таблица повторяемости

Вещество	Восстановление	RSDr %	HorRat (r)
Ацесульфам	83 % – 120 %	0.9 % – 5.0 %	0.05 – 0.20
Аспартам	68 % – 110 %	1.8 % – 21.6 %	0.12 – 0.87
Цикламат	84 % – 116 %	0.6 % – 3.9 %	0.04 – 0.16
Сахарин	80 % – 126 %	1.1 % – 3.5 %	0.04 – 0.18
Стевиозид	60 % – 112 %	0.8 % – 11.8 %	0.04 – 0.60
Сукралоза	70 % – 119 %	1.7 % – 15.4 %	0.10 – 0.63

11.6 Внутрилабораторная погрешность

Внутрилабораторная погрешность была оценена путем анализа образцов, содержащих 50 мкг/л, 250 мкг/л и 1000 мкг/л в различные моменты времени в течение нескольких дней. Результаты представлены в следующих таблицах. Подсчет представляет собой количество точек, учитываемых для определения средних значений и соответствующего стандартного отклонения (Std. Dev.). Процент восстановления, относительное стандартное отклонение (RSD%) и коэффициент Горвица (HorRat) также представлены для каждого примера.

Таблица 12 - Значения промежуточной точности для ацесульфама калия на 3 уровнях повышения

Ацесульфам	Беловое вино (Б)			Красные (К) и розовые вина(Р)					
Образец	Б1	Б2	Б3	Р1	Р2	Р3	К1	К2	К3
Количеств	12	12	11	12	12	12	12	12	12
Средн. мкг/л	46	223	928	54	252	1089	53	252	1113
Ст. откл.	6.1	31.4	76.6	6.1	23.6	66.3	2.4	9.1	41.3
Восстановление %	91 %	89 %	93 %	108 %	101 %	109 %	106 %	101 %	111 %

RSD% IP	13.2 %	14.1 %	8.2 %	11.3 %	9.4 %	6.1 %	4.5 %	3.6 %	3.7 %
HorRat	0.53	0.72	0.52	0.46	0.48	0.38	0.18	0.18	0.23

Таблица 13 - Значения промежуточной точности для аспартама на 3 уровнях повышения

Аспартам	Белое вино (Б)			Розовое вино (Р)			Красное вино (К)		
Образец	Б1	Б2	Б3	Р1	Р2	Р3	К1	К2	К3
Количеств	11	10	10	11	12	12	11	12	12
Средн. мкг/л	57	281	1190	41	202	841	41	222	998
Ст. откл.	5.5	21.8	91.9	4.1	12.9	73.9	7.5	15.4	43.5
Восстановление %	114	113 %	119 %	82 %	81 %	84 %	83 %	89 %	100 %
RSD %IP	9.6	7.7 %	7.7 %	10.0 %	6.4 %	8.8 %	18.1 %	6.9 %	4.4 %
HorRat	0.38	0.40	0.49	0.40	0.32	0.55	0.73	0.36	0.27

Таблица 14 - Промежуточные значения точности для цикламата натрия на 3 уровнях повышения

Цикламат	Белое вино (Б)			Розовое вино			Красное вино		
Образец	Б1	Б2	Б3	Р1	Р2	Р3	К1	К2	К3
Количеств	10	10	10	11	12	12	12	12	12
Средн. мкг/л	48	237	1011	40	210	918	49	226	999
Ст. откл.	5.5	27.3	134.3	2.5	20.1	70.7	1.3	7.4	26.6
Восстановление %	97%	95%	101%	80%	84%	92%	98%	91%	100 %
RSD% IP	11.3 %	11.5 %	13.3 %	6.3 %	9.6 %	7.7 %	2.7 %	3.3 %	2.7%
HorRat	0.45	0.59	0.84	0.25	0.49	0.48	0.11	0.17	0.17

Таблица 15 - Промежуточные значения точности для сахарина на 3 уровнях повышения

Сахарин	Белое вино (Б)			Красные (К) и розовые вина (Р)					
Образец	Б1	Б2	Б3	Р1	Р2	Р3	К1	К2	К3
Количеств	11	10	10	12	12	12	12	12	12
Средн. мкг/л	51	241	1010	56	270	1166	44	195	857
Ст. откл.	2.6	8.4	36.8	2.8	10.7	47.6	3.0	8.3	31.7
Восстанов ление %	103 %	96%	101 %	112 %	108 %	117 %	88%	78%	86%
RSD % IP	5.0%	3.5 %	3.6%	5.1%	4.0%	4.1%	6.9 %	4.3 %	3.7 %
HorRat	0.20	0.18	0.23	0.20	0.20	0.26	0.28	0.22	0.23

Таблица 16 - Промежуточные значения точности для стевиозида на 3 уровнях повышения

Стевиозид	Белое вино (Б)			Розовое вино (Р)			Красное вино		
Образец	Б1	Б2	Б3	Р1	Р2	Р3	К1	К2	К3
Количество	11	10	10	12	12	12	12	12	12
Среднее мкг/л	35	232	977	31	210	921	41	208	905
Std. Dev.	6.5	45.8	184. 1	8.1	45.4	184. 4	3.1	22.2	84.5
Восстановл ение %	70%	93%	98%	61%	84%	92%	81 %	83%	91 %
RSD% IP	18.5 %	19.7 %	18.8 %	26.4 %	21.6 %	20.0 %	7.6 %	10.7 %	9.3 %
HorRat	0.74	1.01	1.19	1.06	1.10	1.26	0.31	0.55	0.59

Таблица 17 - Промежуточные значения точности для сукралозы на 3 уровнях повышения

Сукралоза	Белое вино (Б)			Красные (К) и розовые вина (Р)					
Образец	Б1	Б2	Б3	Р1	Р2	Р3	К1	К2	К3
Количество	10	11	11	10	11	12	12	12	12
Средн. мкг/л	51	197	776	51	295	1196	42	228	1069
Ст. откл.	10.4	41.6	137.5	11.9	48.7	184.5	5.3	18.0	51.3
Восстановление %	101 %	79%	78%	101 %	118 %	120 %	85%	91 %	107 %
RSD % IP	20.5 %	21.1 %	17.7 %	23.5 %	16.5 %	15.4 %	12.5 %	7.9 %	4.8 %
HorRat	0.82	1.08	1.12	0.94	0.84	0.97	0.50	0.40	0.30

Таблица 18 - Сводная таблица промежуточной точности

Вещество	**Восстановление**	**RSD%**	**HorRat**
Ацесульфам	89 % –111 %	3.6 % – 14.1 %	0.18 – 0.72
Аспартам	81 % – 119 %	4.4 % – 18.1 %	0.27 – 0.73
Цикламат	80 % – 101 %	2.7 % – 13.3 %	0.11 – 0.84
Сахарин	78 % – 117 %	3.5 % – 6.9 %	0.18 – 0.28
Стевиозид	61 % – 98 %	7.6 % – 26.4 %	0.31 – 1.26
Сукралоза	78 % – 120 %	4.8 % – 23.5 %	0.30 – 1.12

12. Библиография

EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, SANTE/11813/2017, “Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed"Implemented by 01/01/2018

Horwitz W., Albert R., 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. J AOAC Int, 89, 1095-109.
OIV, 2021. International Code of Oenological Practices. Issue 2021, OIV, Paris.
Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives (Text with EEA relevance), 2008. OJ, L354, 16-33.

Приложение

A1. Количественные характеристики для образца вина с добавлением 50 мкг/л каждого подсластителя

Подсластитель	C/H
Ацесульфам K	789.4
Аспартам	586.5
Цикламат Na	282.5
Сахарин	24.3
Сукрало	80.5
Стевиози	224.1

A2 . ***Идентификационные данные подсластителей*** **- дополнительные переходы даны в качестве руководства**

Подсластитель	Дополнительный переход в ESI негативный
Ацесульфам K	162 > 82
Аспартам	293 > 200
Цикламат Na	178 > 96
Сахарин	182 > 106
Сукралоза	397 > 361
Стевиозид	641 > 479 641 > 317

Метод OIV-MA-AS316-01 Метод IV типа

Метод количественного определения содержания глюкозы, яблочной кислоты, уксусной кислоты, фумаровой кислоты, шикимовой кислоты и сорбиновой кислоты в винах с помощью количественной ядерной магнитно-резонансной спектрометрии (^{1}H ЯМР)
(Резолюция Oeno 618/2020)

1. Введение

ЯМР-спектроскопия является так называемым первичным количественным аналитическим методом с широкими линейными диапазонами (5-6 порядков). Многократное подавление сигналов воды и этанола может значительно повысить чувствительность матриц, содержащих воду и этанол (таких как вино), при автоматизированных измерениях. Различные соединения в вине могут быть идентифицированы и количественно определены по конкретным сигналам всего за один анализ.

2. Область применения

Настоящий метод пригоден для количественного определения содержания глюкозы, яблочной, уксусной, фумаровой, шикимовой кислот при их естественном содержании в винах, а также для консерванта сорбиновой кислоты.

Рабочий диапазон мг/л:

Глюкоза	600 - 50000
Яблочная кислота	300 - 5000
Уксусная кислота	30 - 2000
Фумаровая кислота	20 - 300
Шикимовая кислота	20 - 500
Сорбиновая кислота	20 - 800

3. Сокращения

ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
1H ЯМР	Протонный ядерный магнитный резонанс
TSP	3-(триметилсилил)пропионовая кислотна-4d натриевая соль
PULCON	Определение концентрации на основе длины импульса

4. Сущность метода

Пробу вина разбавляют 10% буфером в тяжелой воде D_2O. TSP используют в качестве внутреннего стандарта для корректировки химического сдвига (δ) (0 млн−1). После этого образец измеряют с помощью 1H ЯМР. Необходимо применить по крайней мере однократное подавление сигнала воды. Для повышения чувствительности также следует подавить сигнал этанола. Выбранные винные аналиты оценивают и количественно определяют на основе соответствующих сигналов (см. 11.1 Приложение, Таблица 1).

5. Реактивы и материалы

Используемые реактивы и вода (5.8) должны быть свободны от определяемых аналитов. Если не указано иное, раствор означает водный раствор.

5.1 Оксид дейтерия (99.9 атом %D) CAS 7789-20-0

5.2. 3 - (триметилсилил) пропионовая кислота 2,2,3,3-d4 натриевая соль (TSP) (98 атом % D) CAS 24493-21-8

5.3 Буферный раствор pH 2,9–3,3 для регулирования уровня pH вина.

Например: одномолярный KH_2PO_4 (дигидрофосфат калия, CAS 7778-77-0, 0,1 % TSP (натриевая соль 3-(триметилсилил)пропионовой кислоты) (5.2), 3 мМ NaN3 (азид натрия, CAS 26628-22-8) в D_2O (5,1), pH 3,10

5.4 одномолярная соляная кислота, CAS 7647-01-0

5.5 одномолярный гидроксид натрия, CAS 1310-73-2

5.6 Буферные растворы для калибровки электродов

pH 4,00 и pH 2,00 (сертифицированный эталонный материал, напр. Certipur®)

5.7 Моногидрат лимонной кислоты, CAS 5949-29-1

5.8 Вода ультрачистая, ISO 3696.

6. Аппаратура

Мембранные фильтры (6.8) должны быть свободны от определяемых аналитов.

6.1 ЯМР-трубки диаметром 5 мм, макс. ±1 % отклонение внутреннего диаметра

6.2 Ассиметричный волчок с шаблоном для настройки трубок ЯМР

6.3 Устройство для измерения уровня pH (±0,01 единиц pH)

6.4 Автоматическая система титрования (доводка pH до ±0,01 ед. pH) с возможностью
альтернативной ручной регулировки

6.5 ЯМР-спектрометр, напр. 400 МГц с зондом 5 мм (z-Gradient) и стабилизацей температуры ± 0,2K

6.6 Пипетки 100 - 1000 мкл

6.7 Реакционные флаконы по 1,5 мл

6.8 Мембранный фильтр из поливинилиденфторида (ПВДФ), размер пор 0,2 мкм, диаметр 15 мм

7. Отбор проб

Пробы вина должны быть прозрачными, в противном случае они должны быть отфильтрованы (6.8). Для пробоподготовки вина разбавляют 10% буффером в D_2O. TSP используют в качестве внутреннего стандарта для обозначения химического сдвига до δ 0 млн−1. Конечный уровень pH растворов образцов должен составлять 3,10 ± 0,02.

Например, 900 мкл вина смешивают со 100 мкл буфера (5.3), а уровень pH доводят точно до 3,10 (+/- 0,02 единицы pH) соляной кислотой (5.4) или гидроксидом натрия (5.5), чтобы использовать параметры количественного определения в Приложении 11.1, Таблица 1. Для этого следует использовать подходящие автоматические системы титрования или ручную регулировку с помощью высокоточного pH-метра. Из этой смеси 600 мкл переносят в ЯМР-пробирку диаметром 5 мм и проводят измерение.

8. Проведение исследования

8.1 ЯМР-спектрометр и измерения

Измерения должны выполняться с использованием схем подавления сигналов воды и этанола путем многократного перенасыщения. Существует ряд методов подавления нежелательных сигналов, таких как выборочное множественное предварительное оповещение и метод WATERGATE. Для качественного подавления сигнала воды, спектрометры оснащены соответствующей последовательностью импульсов.

Отношение сигнал/шум выбранных сигналов для количественного определения аналитов должно превышать 10:1.
Как правило, основные параметры следующие:

- Задержка рециркуляции должна составлять не менее 6 секунд.
- Измерения должны выполняться при температуре 300 K (27 °C) с температурной стабильностью ± 0,2 K без вращения.
- Разрешение ≥ 16 пунктов/Гц
- Ширина развертки (ШР) ≥ 18 млн$^{-1}$.
- Калибровку и измерения образцов вина необходимо проводить при одном и том же угле импульса.

8.2 Количественное определение соединений

Количественное определение проводят по рекомендованным площадям/интенсивностям сигналов аналитов (см. 11.1 Приложение, Таблица 1). Оно может быть проведено путем внутренней или внешней (PULCON) стандартизации и калибровки. Сигналы соответствующих аналитов должны быть соотнесены с Таблицей (см. 11.1 Приложение, Таблица 1). Чистые стандарты в сравнимых концентрациях должны быть измерены в тех же условиях, что и образцы, чтобы получить дополнительный поправочный коэффициент реакции для рассматриваемого аналита (например, путем экспериментов с добавлением пиков). Подходящие сигналы целевых веществ перечислены в 11.1, Приложение, Таблица 1.

9. Расчеты

9.1 **Расчет с внутренним стандартом**

Для количественного определения соответствующие сигналы аналитов можно оценить по следующей формуле (внутренний стандарт):

$$m_x = \frac{MW_x}{MW_{std}} \cdot \frac{nH_{std}}{nH_x} \cdot \frac{A_x}{A_{std}} \cdot m_{std} \cdot CF$$

m_x и m_{std}	Массы аналита и стандарта [г]
MW_x и MW_{std}	Молекулярные массы аналита и стандарта [г/моль]
nH_x и nH_{std}	Числа протонов аналита и стандарта
A_x и A_{std}	Площади выбранных пиков аналита и стандарта
x	Аналит
std	Эталонный стандарт, внутренний стандарт (напр. TSP 5.2)
CF	Поправочный коэффициент - см. 11.1 Приложение, Таблица 1 (при необходимости, полученный путем экспериментов с добавлением рассматриваемого аналита)

9.2 Расчет с внешним стандартом, метод PULCON

Для количественного определения соответствующие сигналы аналитов могут оцениваться согласно методу PULCON по следующей формуле F1. Для количественного определения в каждом цикле используют внешний образец с известной концентрацией подходящих для калибровки веществ, например, образец $Quant_{ref}$ (лимонная кислота 20 г/л). Итоговый количественный коэффициент является частью данных каждого образца. Выборка $Quant_{ref}$ используется для расчета *fq* по формуле F2. Метод PULCON основан на следующей формуле:

F.1

Где

γ_{An} = искомая массовая концентрация аналита (в мг/л)
I_{An} = абсолютный интеграл аналита в образце
SW_{An} = ширина спектра (например, 20,55 м.д.)
M_{An} = молярная масса аналита (г/моль)
P_{An} = длина импульса возбуждения, используемого для образца (мкс)
k_{An} = поправочный коэффициент (при необходимости, полученный в результате экспериментов с добавлением рассматриваемого аналита)
SI_{An} = размер (например, 131072)
qf = коэффициент количественного определения среднего значения для $Quant_{Ref}$

$$\gamma_{An} = \frac{I_{An} \cdot SW_{An} \cdot M_{An} \cdot P_{An} \cdot k_{An}}{SI_{An} \cdot qf \cdot P_{Ref} \cdot N_{H,An} \cdot d_{An}^2 \cdot NS_{An}}$$

P_{Ref} = длительность импульса возбуждения, используемая для $Quant_{Ref}$ (в мкс)

$N_{H, An}$ = количество протонов на молекулу анализируемого аналита
d_{An} = внутренний диаметр трубки с аналитом
NS_{An} = количество полученных ПИД для пробирки с аналитом

F.2 $$qf = \frac{I_{Ref} \cdot SW_{Ref} \cdot M_{Ref}}{SI_{Ref} \cdot \gamma_{Ref} \cdot N_{H,Ref} \cdot d_{Ref}^2 \cdot NS_{Ref}} \ (\text{in } \frac{\text{a.u.} \cdot \text{ppm} \cdot \text{l}}{\text{mol}})$$

Где
I_{Ref} = абсолютный интеграл опорного сигнала
SW_{Ref} = ширина спектра (например, 20,55 млн−1)
M_{Ref} = молярная масса эталонного вещества (г/моль)
SI_{Ref} = размер (напр. 131072 = 128k = 2^{17})
γ_{Ref} = массовая концентрация эталонного вещества
$N_{H, Ref}$ = количество протонов на анализируемого эталонного вещества
d_{Ref} = внутренний диаметр пробирки для образца для эталонной пробирки
NS_{Ref} = количество полученных ПИД для эталонного вещества
Спектры, соответствующие стандарту и аналиту, должны быть получены при одинаковой настройке чувствительности приемника (коэффициент усиления приемника). Также рекомендуется сохранить все параметры измерения на одинаковом уровне (температура, тип пробирки, *SI*, *SW*, *NS*) при определении показателей *qf* или y_{An}.

9.3 Выражение результатов

Результаты должны быть выражены в мг/л с одним десятичным знаком для второстепенных компонентов (<1 г/л) и без десятичных знаков для основных компонентов (>1 г/л).

10. Характеристики точности метода

Для достижения наиболее реалистичного представление о эффективности метода было проведено кольцевое испытание. Подробности приведены в Godelmann et al. 2016.

10.1 **Повторяемость и воспроизводимость**

В таблице 1 приведены относительные стандартные отклонения повторяемости и воспроизводимости для различных аналитов (Godelmann et al. 2016).

Таблица 1: Относительные стандартные отклонения повторяемости и воспроизводимости, взятые из проверки квалификации (Godelmann et al. 2016) для различных аналитов.

	Глюкоза	**Яблочная кислота**	**Уксусная кислота**	**Фумаровая кислота**	**Шикимовая кислота**	**Сорбиновая кислота**
NMRP01 (эталонное вино)						
Количество лабораторий	15	14	15	14	13	14
Среднее мг/л	9903	2628	1056	82,1	103,6	126,1*
RSDr %	1,5	1,7	1,4	1,5	1,8	7,5
RSDR %	5,5	4.3	7,5	12,5	5	11,9
NMRP02 (белое вино)						
Количество лабораторий	15	14	15	14	13	15
Среднее мг/л	28304	3528	868	12.1 (<LOQ)	45,8	164,6
RSDr %	1,3	1,7	1,6		4	2.1
RSDR %	4.6	14.3	9		18,3	5.1
NMRP03 (красное вино)						
Количество лабораторий	14	9	14	13	13	14
Среднее мг/л	11505	240 (<LOQ)	544	29.1	34,6	149,7
RSDr %	2.2		3,6	3.1	14,7	2,7
RSDR %	4.3		7.6	9.1	20	5.4
NMRP04 (красное вино)						
Количество лабораторий	14	11	14		13	5
Среднее мг/л	12538	251	627	Неопр.	61,8	10,9 (<LOQ)
RSDr %	1,7	6,6	2,7		9.4	
RSDR %	3,9	11,4	5,8		15,3	
NMRP05 (белое вино)						
Количество лабораторий	14	13	14	13	13	15
Среднее мг/л	30303	2615	1011	27.1	29,3	191,8
RSDr %	3.2	4.6	2,7	3	8,8	3,9
RSDR %	5	13,7	7	5.3	15,6	7
NMRP06 (красное вино)						
Количество лабораторий	14	11	14	4	12	14
Среднее мг/л	6090	267	630	Неопр.	30	158,5
RSDr %	3	6.1	2.1		9,6	4.3
RSDR %	5.3	10.2	4.9		12,6	6.3
NMRP07 (белое вино)						
Количество лабораторий	13	10	14	14	13	4
Среднее мг/л	5297	8036	794	Неопр.	36,2	3.2 (<LOQ)
RSDr %	1,5	3,7	2,6		11,5	
RSDR %	6.3	5,9	7.4		14,7	
NMRP08 (белое вино)						
Количество лабораторий	14	14	14	13	13	6
Среднее мг/л	16518	5254	301	Неопр.	68,4	5.4 (<LOQ)
RSDr %	1	2.2	3		4.2	
RSDR %	4,5	8,6	7.1		6.4	
NMRP09 (белое вино)						
Количество лабораторий	14	12	14	14	13	15
Среднее мг/л	2091	2390	176	45,9	44.1	98
RSDr %	3.1	2,6	4.6	2.2	4.3	1,8
RSDR %	6,6	5.7	12	4.6	8.4	5.1
NMRP10 (красное вино)						
Количество лабораторий	9	7	14	15	13	15
Среднее мг/л	442 (<LOQ)	178 (<LOQ)	502	90,6	58	200,3
RSDr %			2,4	2,5	5,2	2,9
RSDR %			11,7	7.7	16,4	6,8

10.2 Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) должны быть оценены лабораториями индивидуально и зависят от используемой системы ЯМР (в особенности от напряженности поля). В качестве наглядного примера, LOD и LOQ, перечисленные в таблице 2, были рассчитаны в соответствии с инструкциями резолюции OENO 7-2000 (E-AS1-10-LIMDET) на основе предварительной подготовки пробы и установленных параметров ЯМР-измерения (частота 400 МГц и с подавлением уровня этанола).

Таблица 2: Предел обнаружения и предел количественного определения

Аналит	**LOD мг/л**	**LOQ мг/л**
Глюкоза	150	600
Яблочная кислота	90	300
Уксусная кислота	10	30
Фумаровая кислота	5	20
Шикимовая кислота	5	20
Сорбиновая кислота	5	20

11. Приложение

11.1 Таблица 1. Параметры количественного определения при 400 МГц, pH 3,10

Аналит	Молярность (г/моль)	Сигнал, используемый для количественной оценки	Кол-во протонов	Описание	Типичный регион (пример) млн−1	Поправочный коэффициент	Комментарий для коррекции
Яблочная кислота	134	H3B, 4 сигнала @ прибл. 2,88 млн−1	1	Область: левый сигнал +4,5 Гц, правый сигнал -4,5 Гц Локальная коррекция базовой линии	2,8465-2,9216	1,05	В силу усеченной области
Сорбиновая кислота	112	Половина H2, левый сигнал Дублета @ прибл. 5,85 млн−1	0,5	Область: левый сигнал дублета ± 7 Гц Локальная коррекция базовой линии	5.8250-5.8600	0,95	В силу эффекта крыши дублета
Фумаровая кислота	116	H2+H3, синглет @ прибл. 6,75 млн−1	2	Область: сигнал ± 3 Гц, локальная коррекция базовой линии (нулевой/первый порядок)	6.7350-6.7600	1,00	-
Уксусная кислота	60	H2A + H2B + H2C, синглет @ прибл. 2,07 млн−1	3	Область: сигнал ± 3 Гц, локальная коррекция базовой линии (нулевой порядок)	2.0720-2.0830	1,28 (комбинированный коэффициен	За счет T1 (коэффициент 1,16) и усеченной области (коэффициент 1,1)
Глюкоза	180	HL-альфа, Дублет @ прибл. 5,21 млн−1	1	Область: центр дублета ±5 Гц, локальная коррекция базовой линии (нулевой порядок)	5.1900-5.2300	2,50 (комбинированный коэффициен	альфа/бета-глюкоза (фактор 2,33), усеченная область (фактор 1,07)
Шикимовая кислота	174	H2, высший порядок (5) @ прибл. 6,8 млн−1	1	Область: Центр мультиплета ±6 Гц Локальная коррекция базовой линии (нулевой/первый порядок)	6.7850-6.8200	1,00	-

11.2 Точность/Извлечение

Извлечение для кольцевых тестовых образцов определяли путем сравнения средних значений результатов, полученных методом ЯМР с анализом соответствующего параметра результата, полученного методом OIV (ВЭЖХ и ферментативный методы для уксусной кислоты и ВЭЖХ для фумаровой кислоты).
Рассчитанные извлечения составляют:
для глюкозы 100,3 % (n=9, 95,2–106,4), для уксусной кислоты 108,9 % (n=10, 99,9–123), для яблочной кислоты 104,1 % (n=7, 91,4–124,1), для шикимовой кислоты 105,2 % (n=10, 91.2 - 122,3), для сорбиновой кислоты 100,2 % (n=8, 97,9 - 102,5), для фумаровой кислоты 96,8 % (n=6, 80,5 - 104,1).
Только результаты для уксусной кислоты оказались выше 100% при общем среднем значении 109%.

На результаты мог повлиять поправочный коэффициент 1,28 - см. 11.1 Приложение, Таблица 1. Извлечение рассчитывается на основе анализа эталонных значений, полученных с помощью методов OIV.

Таблица 2 Извлечение аналитов

Аналит	**Среднее восстановление % n: количество образцов для кольцевых испытаний, включенных в расчеты**	**Вариативность %**
Глюкоза	100,0 (n=9)	95,2 - 106,4
Яблочная кислота	104,1 (n=7)	91,4 - 124,1
Уксусная кислота	108,9 (n=10)	99,9 - 123
Фумаровая кислота	96,8 (n=6)	80,5 - 104,1
Шикимовая кислота	105,2 (n=10)	91,2 - 122,3
Сорбиновая кислота	100,2 (n=8)	97,9 - 102,5

11.3 Значение HorRat значения всех соединений

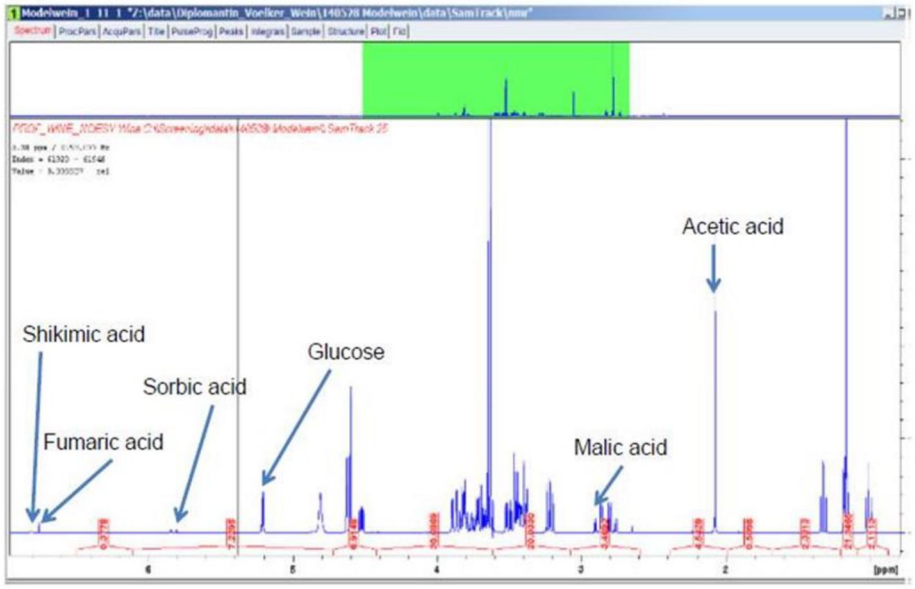
Таблица 4

Параметр		**Значение HorRat**		**Образцы**
				<LOQ
	0,5 - 1,5	**1,6 - 2,0**	**> 2,0**	
Уксусная кислота	7 (0,8 - 1,3)	3 (1,6; 1,6; 1,9)	0	0
Яблочная кислота	4 (0,9 - 1,5)	2 (1,6; 2,0)	2 (2,8; 3,1)	2
Глюкоза	9 (1,0 - 1,5)	0	0	1
Сорбиновая кислота	7 (0,6 - 1,5)	0	0	3
Фумаровая кислота	6 (0,5 - 1,5)	0	0	4
Шикимовая кислота	4 (0,6 - 1,3)	5 (1,6; 1,6; 1,8; 1,9; 2,0)	1 (2,1)	0

OИВ-MA-AC316-01 : R2020

11.4 Пример спектра ЯМР

Figure 1. NMR spectra of model wine with selected signals for quantification



12. Библиография

1. Godelmann R., Fang Fang, Humpfer E., Schütz B., Bansbach M., Schäfer H., Spraul M., (2013), Targeted and Nontargeted Wine Analysis by 1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation
of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage,
J. Agric. Food Chem. 61, 5610-5619
2. Monakhova Y.B., Schäfer H., Humpfer E., Spraul M., Kuballa T., Lachenmeier
D., (2011), Application of automated eightfold suppression of water and ethanol
signals in 1H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages, Magn. Reson. Chem. 49,734-739
3. G. Wider, L. Dreier: Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy,
J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2571-2576
4. Godelmann R., Kost C., Patz C., Ristow R., Wachter H., (2016), Quantitation of
compounds in wine using 1H NMR spectroscopy - Description of the method and collaborative study, Journal of AOAC International Vol. 99, No. 5, 1295-1304
5. Horwitz W. (1995) Protocol for the design, conduct and interpretation of method- performance studies, Pure and Applied Chemistry 67, 331-343
6. Horwitz, W. (1982) Anal. Chem. 54, 67A-76A
7. Peeler, J.T., Horwitz W., & Albert R. (1989) J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72, 784-806
8. Herbert-Pucheta, J.E., Mejía-Fonseca, I., Zepeda-Vallejo, L.G., Milmo-Brittingham, D., Maya, G.P. The “Wine-Tl” NMR experiment of novel wine-metabolome fingerprinting with nuclear-spin relaxation DOI: 10.1051/bioconf/20191202029
9. Herbert-Pucheta, J.E., Pino-Villar, C., Rodríguez, González, F., Padilla-Mata, G., Milmo-Brittingham, D., Zepeda-Vallejo, L.G. “One-shot” analysis of wine

parameters in non-Saccharomyces large-scale alcohol reduction processes with
one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance, DOI: 10.1051/bioconf/20191502016

10. Resolución OENO 7-2000 (E-AS1-10-LIMDET), “Estimación del límite de detección y de cuantificación de un método de análisis”
11. ISO 3696.

Метод OIV-MA-AS321-01 Метод IV-го типа

Общий бромид

1. Сущность метода

Вино озоляют при 525°C в присутствии избытка натронной извести. Раствор остатка (при pH 4,65) обрабатывают хлорамином Т для высвобождения бромида. Бромид вступает в реакцию с фенолсульфонефталеином, образуя 3',3",5',5"-Тетрабромфенол-сульфон-фталеиновую кислоту, которую определяют на спектрофотометре при 590 нм.

2. Аппаратура

2.1 Кипящая водяная баня 100°C

2.2 Электропечь с регулируемой температурой

2.3 Спектрофотометр, способный измерять оптическую плотность при длинах волн от 300 до 700 нм.

3. Реагенты

3.1 Раствор гидроксида натрия, 50% (м/м)

3.2 Суспензия гидроксида кальция, содержащая 120 г оксида кальция на литр.

3.3 Раствор фенолсульфонефталеина:

0,24 г фенолсульфонефталеина (феноловый красный) растворяют в 24 мл раствора едкого натра, 0,1 М, и доводят до литра дистиллированной водой.

3.4 Буферный раствор с уровнем pH 4,65:

Уксусная кислота, 2 М ..... 500 мл
Гидроксид натрия, 2 М..... 250 мл
Дистиллированная вода ..... 1 л

3.5 Окисляющий раствор:

Хлорамин Т ..... 2 грамм
Дистиллированная вода ..... 1 л

Раствор готовят за 48 часов до использования. Срок и условия хранения: две недели при температуре ± 4 °C.

3.6 Восстановительный раствор:

Тиосульфат натрия ..... 25 г/л.
Дистиллированная вода ..... 1 л

3.7 Серная кислота, 10% (об./об.): серная кислота (ρ20 = 1,84 г/мл), разбавленная 1/10.

3.8 Серная кислота, 1% (об./об.): серная кислота (ρ20 = 1,84 г/мл), разбавленная

1/100.

3.9 Раствор бромида калия, соответствующий 1 г бромида на литр. 1,489 г бромида калия, KBr, растворяют в дистиллированной воде и доводят до одного литра.

4. Проведение исследования

4.1 *Способ получения золы и зольного раствора*

50 мл вина наливают в кварцевую чашку диаметром 7 см, добавляют 0,5 мл 50% раствора гидроксида натрия (3.1) и 1 мл суспензии гидроксида кальция (3.2). Необходимо убедиться, что уровень pH не ниже 10. Чашку, накрытую часовым стеклом, оставляют на 24 часа. Жидкость выпаривают досуха на кипящей водяной бане. Для ускорения испарения на последних стадиях можно использовать поток горячего воздуха.

Процедура золения следующая: чашку помещают на 30 минут в печь (2.2) при температуре 525°C. После охлаждения остаток смешивают с небольшим количеством дистиллированной воды. Выпаривают на кипящей водяной бане. Снова золят при 525°C. Процедуру повторяют, пока пепел не станет серым/белым.

Остаток смешивают с 5 мл кипящей дистиллированной воды. Добавляют с помощью бюретки: сначала 10%-ную серную кислоту (3.7), затем 1%-ную серную кислоту (3.8) в количестве, достаточном для доведения уровня pH до 4–5, согласно индикаторной бумаге. Пусть X мл = добавленный объем серной кислоты (3.7 и 3.8). Добавляют 10,2-(X+5) мл дистиллированной воды. Выпавший в осадок сульфат кальция толкут стеклянной палочкой. Содержимое чашки переносят в пробирку для центрифугирования. Центрифугируют 10 мин. 8-9 мл прозрачного супернатанта помещают в пробирку.

4.2 *Качественная проба*

Настоящую пробу проводят для определения, содержится ли бром в винах в пределах от 0 до 1 мг/л. Данный предел позволяет проводить определение в неразбавленном растворе золы.

В небольшую пробирку помещают:

- 1 мл зольного раствора
- 1 каплю буферного раствора pH 4,65
- 1 каплю раствора фенолсульфонефталеина
- 1 каплю раствора хлорамина T

Ровно через 1 минуту реакцию останавливают, добавив 1 каплю раствора тиосульфата натрия.

Если полученная окраска желтая, коричневато-желтая или зеленовато-желтая, раствор золы можно использовать неразбавленным.

Если полученная окраска синяя, пурпурная или фиолетовая, вино содержит более 1 мг бромида на литр, и раствор золы необходимо разбавлять 1/12 или 1/5 до тех пор, пока полученная окраска не будет соответствовать указанным выше параметрам.

4.3 *Количественная проба*

В пробирку помещают:

- 5 мл зольного раствора, разбавленного или неразбавленного, затем добавляют:
- 0,25 мл буферного раствора pH 4,65
- 0,25 мл раствора фенолсульфонефталеина
- 0,25 мл раствора хлорамина T

Спустя ровно 1 минуту добавляют:

- 0,25 мл тиосульфата натрия

Исследуют на спектрофотометре при 590 нм в кювете с оптическим путем 1 см и сравнивают с контролем, полученным при добавлении такого же количества реагентов к 5 мл дистиллированной воды.

Примечание: При низком содержании бромида (желтая, слегка зеленоватая окраска) определяют оптическую плотность в кювете с оптическим путем 2 см.

4.4 *Подготовка калибровочной кривой*

Перед использованием готовят раствор, содержащий 10 мг брома на литр, делая 2 последовательных разведения (1/10) стандартного раствора бромида калия, 1 г/л.

В набор из 8 пробирок помещают по 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 2,00 и 2,50 мл стандарта бромида, 1 г/л (3.9) и доводят до 5 мл дистиллированной водой. (Растворы эквивалентны 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,80 и 1 мг брома на литр вина без разбавления зольным раствором). Действуют согласно 4.3, используя калибровочные растворы вместо зольного раствора. Определяют оптическую плотность данных растворов и контрольного образца согласно 4.3, используя 5 мл дистиллированной воды в контрольном растворе. Полученный уровень абсорбции, соответствующий концентрации бромида, наносят на линию, слегка изогнутую в направлении начала координат.

5. Выражение результатов

5.1 *Расчеты*

Содержание бромида в вине получают путем нанесения на калибровочную кривую уровень чистой абсорбции раствора золы (принимая во внимание толщину используемой ячейки и любое разбавление раствора золы) и интерполяции концентрации брома. Общее содержание бромида выражается в миллиграммах на литр (мг/л) с точностью до двух знаков после запятой.

БИБЛИОГРАФИЯ

DAMIENS A., *Bull. Sci. Pharmacologiques,* 1920, **27**, 609; Ibid, 1921, **28**, 37, 85 et 105.
BALANTRE P., *J. Pharm. Chem.,* 1936, **24**, 409.
PERRONET M., ROCQUES Mme S., *Ann. Fals. Fraudes,* 1952, **45**, 347.
CABANIS J.-C., *Le brome dans les vins,* Thèse doct. Pharm., Montpellier, 1962.
JAULMES P., BRUN Mme S., Cabanis J.-C., *Chim anal.,* 1962, 327.
STELLA C., *Riv. Viticolt. Enol.,* Conegliano, 1967, 5.

Метод OIV-MA-AS321-02 Метод II-го типа

Хлорид

1. Сущность метода

Хлорид определяют непосредственно в вине потенциометрическим методом с использованием хлоридсеребряного электрода.

2. Аппаратутра

2.1 pH-милливольтметр градуированный с интервалом не менее 2 мВ;

2.2 Магнитная мешалка;

2.3 Хлоридсеребряный электрод с насыщенным раствором нитрата калия в качестве электролита;

2.4 Микробюретка с градуировкой 0,01 мл;

2.5 Хронометр.

3. Реактивы

3.1 Стандартный раствор хлорида: 2,1027 г хлорида калия, KCl (не более 0,005% Br), высушенный перед применением путем помещения в эксикатор на несколько дней, растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л. 1 мл этого раствора содержит 1 мг Cl^-.

3.2 Раствор нитрата серебра: 4,7912 г нитрата серебра аналитической чистоты, $AgNO_3$, растворяют в растворе этанола, 10% (об./об.) и доводят до одного литра. 1 мл этого раствора соответствует 1 мг Cl^-.

3.3 Азотная кислота, чистота не менее 65% (ρ_{20} = 1,40 г/мл).

4. Проведение исследования

4.1 5,0 мл стандартного раствора хлорида (3.1) помещают в цилиндрический сосуд объемом 150 мл, поставленный на магнитную мешалку (2.2), разбавляют дистиллированной водой примерно до 100 мл и подкисляют 1,0 мл азотной кислоты (3.3). После погружения электрода в микробюретку добавляют раствор нитрата серебра (3.2) при умеренном перемешивании, используя следующую процедуру: начинают с добавления первых 4 мл частями по 1 мл и считывают соответствующие значения в милливольтах. Добавляют следующие 2 мл частями

по 0,20 мл. Наконец, добавляют частями по 1 мл до 10 мл. После каждого добавления необходимо подождать примерно 30 секунд, прежде чем считать соответствующее значение в милливольтах. Полученные значения наносят на график относительно соответствующих миллилитров титранта и определяют потенциал, соответствующий точке эквивалентности.

4.2 5 мл стандартного раствора хлорида (3.1) помещают в цилиндрический сосуд объемом 150 мл с 95 мл дистиллированной воды и 1 мл азотной кислоты (3.3). Погружают электрод и титруют, помешивая, до получения потенциала точки эквивалентности. Данное определение повторяют до тех пор, пока не будет получена хорошая степень совпадения результатов. Эту проверку необходимо проводить перед каждой серией измерений содержания хлоридов в пробах.

4.3 50 мл вина помещают в цилиндрический сосуд объемом 150 мл. Добавляют 50 мл дистиллированной воды и 1 мл азотной кислоты (3.3) и титруют согласно процедуру из п. 4.2.

5 Выражение результатов

5.1 *Расчеты*

Если *n* представляет количество миллилитров титранта нитрата серебра, то содержание хлорида в испытуемой жидкости определяется по формуле:

20 x *n*, выраженное в миллиграммах Cl на литр

0,5633 x *n*, выраженное в миллиэквивалентах на литр,

32,9 x *n,* выраженное в миллиграммах NaCl на литр.

5.2 *Повторяемость (r):*

r = 1,2 мг Cl/л

r = 0,03 мЭкв/л

r = 2,0 мг NaCl/л

5.3 *Воспроизводимость*(R)

R= 4,1 мг/л

R = 0,12 мЭкв/л

R= 6,8 мг NaCl/л

6. Примечание: для очень точного определения.

См. полную кривую титрования, полученную при определении тестовой жидкости (4.2).

a) 50 мл анализируемого вина наливают в цилиндрический сосуд

объемом 150 мл. Добавляют 50 мл дистиллированной воды и 1 мл азотной кислоты (3.3). Титруют раствором нитрата серебра (3.2), добавляя по 0,5 мл за раз и записывая соответствующий потенциал в милливольтах. По результатам первого титрования оценивают приблизительный объем необходимого раствора нитрата серебра (3.2).

b) Повторяют определение, добавляя по 0,5 мл титранта за раз, пока добавленный объем не станет на 1,5–2 мл меньше объема, определенного в (a). Затем добавляют по 0,2 мл за раз. Продолжают добавлять раствор выше расчетной точки эквивалентности симметричным образом, т. е. по 0,2 мл, а затем по 0,5 мл за раз.

Конечную точку измерения и точный объем израсходованного нитрата серебра получают:

— путем построения кривой и определения точки эквивалентности;
— по следующей формуле:

$$V = V' + \Delta V_i \quad \frac{\Delta\Delta E_1}{\Delta\Delta E_1 + \Delta\Delta E_2}$$

Где:
V = объем титранта в точке эквивалентности;
V'= объем титранта до наибольшего изменения потенциала;
ΔV_i = постоянный объем порций титранта, т.е. 0,2 мл;
ΔE_1= вторая разность потенциалов до наибольшего изменения потенциала;
ΔE_2 = вторая разность потенциалов после наибольшего изменения потенциала.

Пример:

Объем титрующего раствора AgNO3	E потенциал в мВ	Разница ΔE	Вторая разница ΔΔE
0	204		
0,2	208	4	0
0,4	212	4	2
0,6	218	6	0
0,8	224	6	0
1,0	230	6	2
1,2	238	8	4
1,4	250	12	10
1,6	272	22	22
1,8	316	44	10
2.0	350	34	8
2.2	376	26	6
2,4	396	20	

В приведенном примере конечная точка титрования находится между 1,6 и 1,8 мл: в этом интервале происходит наибольшее изменение потенциала (ΔE = 44 мВ). Объем титранта нитрата серебра, использованный для измерения содержания хлоридов в испытуемом образце, составляет:

$V = 1{,}6 + 0{,}2\ \frac{22}{22+10} = 1{,}74$ мл

БИБЛИОГРАФИЯ

MIRANDA PATO C. de, *F.V., O.I.V.,* 1959, n°12.
HUBACH C.E., *J. Ass. Off. Agric. Chem,* 1966, **49**, 498.
Fédération internationale des Producteurs de jus de fruits, *F. O.I. V.*,1968, n°37.
JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.,* 1973, n°440.

Метод OIV-MA-AS321-03 Метод II-го типа

Определение содержания фтора в винах с помощью фторидселективного ионного электрода и стандартного метода добавления
(Резолюция Oeno 22/2004)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий метод применяется для анализа содержания фтора во всех винах. При правильном разбавлении диапазон обнаружения составляет от 0,1 мг/л до 10,0 мг/л.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Уровень концентрации фтора в образце измеряют после добавления буфера с использованием фторид-ион-селективного электрода. Буфер обеспечивает высокую постоянную фоновую ионную силу; образует комплекс железа и алюминия (которые в противном случае образовали бы комплексы с фторидом); регулирует уровень pH до уровня, сводящего к минимуму образование комплекса фтороводорода (HF• HF). После этого матричные эффекты минимизируются с помощью стандартного добавления.

3. РЕАКТИВЫ

3.1 **Деионизированная или дистиллированная вода**
3.2 **Хлорид натрия** ≥ чистота 99,0%
3.3 **Тринатриевый цитрат** ≥ чистота 99,0%
3.4 **CDTA** (1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота гидрат) чистота ≥ 98,0 %
3.5 **Гидроксид натрия** чистота ≥ до 98,0 %
3.6 Раствор гидроксида натрия 32% (масс./об.) на основе п. 3.5
3.7 Ледяная уксусная кислота ≥ чистота 99,0%
3.8 Фторид натрия ≥ чистота 99,0%
3.9 Коммерческий буфер для регулирования общей ионной силы (TISAB) (например, III-Orion Research Inc. Кат. № 940911) или аналогичный (см. 4.2).

3.10 Альтернатива TISAB:

3.10.1 Примерно 700 мл воды (3.1) наливают в 1-литровый химический стакан (4.3), добавляют 58,0 г ± 0,1 г хлорида натрия (3.2) и 29,4 г ± 0,1 г тринатрий цитрата (3.3).

3.10.2 Растворяют 10,0 г ± 0,1 г CDTA (3.4) и 6 мл 32% (масс./об.) гидроксида натрия (3.6) примерно в 50 мл. дистиллированной воды. (3.1)

3.10.3 Оба раствора смешивают, затем добавляют 57 мл ледяной уксусной кислоты (3.7) и доводят pH до 5,5 с помощью 32% (масс./об.) гидроксида натрия (3.6). Остужают до комнатной температуры, переливают в мерную колбу объемом 1 л (4.10), и разбавляют до объема водой (3.1).

3.11 Стандартные растворы фтора

3.11.1 Исходный стандартный раствор фтора (100 мг/л):
В полиэтиленовой мерной колбе объемом 1 л (4.10) взвешивают 221 мг ± 1 мг фторида натрия (3.8) (высушенного при 105 °C в течение 4 часов) и доводят до объема водой. (3.1)

3.11.2 Калибровочные стандарты фтора при 1,0 мг/л, 2,0 мг/л и 5,0 мг/л: готовят калибровочные стандарты 1,0 мг/л, 2,0 мг/л и 5,0 мг/л, пипетируя 1 мл, 2 мл и 5 мл из 100 мг/л маточного стандарта (3.11.1) в три полиэтиленовые мерные колбы объемом 100 мл (4.10) и доводят до объема водой (3.1).

3.12 Контрольный образец вина: вино без содержания фтора используется в качестве контрольного образца.

3.13 Эталонное вино с добавлением 1 мг/л - 10 мл (4.11) стандартного фтористого раствора с концентрацией 100 мг/л (3.11.1) помещают в мерную колбу объемом 1 л (4.10) и доводят до объема вином без содержания фтора (3.12).

4. АППАРАТУТА

4.1 pH-метр (анализатор активности ионов) со стандартной возможностью добавления (например, Corning pH/ionAnalyser 455, № 475344 в каталоге) или анализатор активности ионов с расширенным диапазоном мВ.
4.2 Фторид-ион-селективный электрод и одноперехoдный электрод сравнения или комбинированный электрод (например, Corning Fluoride Electrode, № 34108–490 в каталоге).
4.3 Мерные стаканы полиэтиленовые - 150 мл, 1 л
4.4 Мерный цилиндр из полиэтилена - 50 мл.
4.5 Магнитная мешалка
4.6 Магнитные стержни с тефлоновым покрытием
4.7 Пластиковые флаконы с крышками по 125 мл (Nalgene или аналогичные)
4.8 Пипетка прецизионная, 500 мкл
4.9 Ультразвуковая ванна
4.10 Колбы мерные класса А объемом 50 мл, 100 мл и 1 л
4.11 Пипетки мерные класса А, 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл, 20 мл и 25 мл

5. ПОДГОТОВКА КАЛИБРОВОЧНЫХ СТАНДАРТОВ

5.1 25 мл (4.11) стандартных растворов 1,0 1,0 мг/л, 2,0 мг/л и 5,0 мг/л (3.11.2) помещают в три мерных стакана на 150 мл (4.3), добавляют 20 мл
(4.10) воды (3.1) и (4.11) по 5 мл коммерческого TISAB (3.9) на каждый стакан. Смешивают при помощи магнитной мешалки. (4.5 и 4.6).

5.2 При использовании альтернативного реактива TISAB (3.10): по 25 мл (4.11) каждого стандартного раствора (3.11.2) помещают в три мерных стакана на 150 мл (4.3) и добавляют 25 мл. (4.11) альтернативного реактива TISAB (3.10) в каждый стакан. Смешивают при помощи магнитной мешалки. (4.5 и 4.6)

6. ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ИСПЫТАНИЙ

Перед отбором проб вино тщательно перемешивают. Игристые вина следует дегазировать путем переливания в чистый цилиндрический стакан и помещения в ультразвуковую баню (4.9) до тех пор, пока не перестанет выделяться газ.

6.1 При использовании коммерческого реактива TISAB (3.9): 25 мл (4.11) пробы вина помещают в цилиндрический стакан объемом 150 мл (4.3) с 20 мл (4.11) воды (3.1) и добавляют 5 мл. (4.11) коммерческого раствора TISAB (3.9). Перемешивают магнитной мешалкой (4.5 и 4.6). Коэффициент разбавления (*DF*) = 1.

6.2 При использовании альтернативного реактива TISAB (3.10): 25 мл (4.11) пробы вина помещают в цилиндрический стакан объемом 150 мл (4.3) и добавляют 25 мл (4.11) альтернативного реагента TISAB (3.10). Смешивают при помощи магнитной мешалки (4.5 и 4.6). Коэффициент разбавления (*DF*) = 1.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения измерений все стандартные растворы и растворы винных проб должны иметь одинаковую температуру.

7.1 Калибровочные стандарты

Потенциал каждого из калибровочных растворов измеряют при помощи анализатора (4.1), фторид-ион-селективного электрода (4.2) и электрода сравнения (4.2). Окончательное показание необходимо снять после стабилизации показаний (стабильность достигается при изменении потенциала не более чем на 0,2–0,3 мВ/3 мин). Показания записывают для каждого из калибровочных стандартов.

Логарифм концентраций, рассчитанный в соответствии с напряжением, измеренным для каждого из калибровочных растворов, наносят на графическую бумагу для определения наклона электрода.

7.2 **Пробы вин**

Потенциал пробы (6.1 или 6.2), выраженный в мВ (E1), измеряют и записывают после стабилизации показаний. К пробе (6.1 или 6.2) добавляют 500 мкл (4.8) 100 мг/л фторидного стандарта (3.11.1). После стабилизации показаний записывают потенциал, выраженный в мВ (E2) винного раствора.
Итоговая концентрация должна как минимум вдвое превышать концентрацию фторида в растворе пробы. Чтобы убедиться, что концентрация фторида в испытуемом образце выше 2 мг/л при первом определении, необходимо провести второе определение после разбавления образца следующим образом (7.2.1 или 7.2.2).
7.2.1. При использовании коммерческого буфера TISAB (3.9): пипеткой (4.11) отбирают 25 мл образца вина в мерную колбу объемом 50 мл (4.10) и доводят до объема водой. 25 мл (4.11) полученного разбавленного вина помещают в цилиндрическую емкость объемом 150 мл. (4.3) и добавляют 25 мл коммерческого буфера TISAB (3.9). Смешивают при помощи магнитной мешалки (4.5 и 4.6), затем выполняют измерение, п. 7.02. Коэффициент разбавления (*DF*) = 2.
7.2.2. При использовании альтернативного буфера TISAB (3.9): пипеткой переносят (4.11) 25 мл образца вина в мерную колбу объемом 50 мл (4.10) и доводят до объема водой. 25 мл (4.11) полученного разбавленного вина помещают в цилиндрическую емкость объемом 150 мл (4.3) и добавляют 25 мл альтернативного буфера TISAB (3.10). Смешивают при помощи магнитной мешалки (4.5 и 4.6), затем продолжают измерение согласно п. 7.2. Коэффициент разбавления: (*DF*) = 2.

8. РАСЧЕТ

Содержание фтора в растворе пробы, выраженное в мг/л, определяется по следующей формуле:

$$C_f = \frac{V_a \times C_a}{V_o} \times \quad \frac{1}{((anti\log \Delta E / S) - 1)}$$

Если добавленный стандартный раствор V_{std} < 1% от объема раствора после добавления, то $V_a = V_o$ и

$$C_f = DF \times Ca \times \frac{1}{((anti\log \Delta E / S) - 1)}$$

C_f = концентрация фтора в растворе пробы (мг/л)

DF = коэффициент разбавления. При необходимости разбавить пробу согласно (7.2.1) или (7.2.2) используют идентичные значения для разбавления и пробы. Иными словами, DF = 2 для разбавленной пробы (7.2.1) и (7.2.2) или DF = 1 при несоответствии (6.1) или (6.2).

V_o = начальный объем раствора образца перед добавлением стандарта (мл)

V_a = объем раствора после добавления стандарта (мл)

ΔE = разность потенциалов E1 и E2, полученных в (7.2), в мВ.

S = наклон калибровочной кривой электрода.

$$C_a = \frac{V_{std} \times C_{std}}{V_{samp}}$$

C_a = концентрация фторида (мг/л), добавленного к объему пробы (V_o), полученная путем умножения объема стандарта (3.11.1), добавленного к раствору (V_{std}), на концентрацию (C_{std}) стандарта (3.11.1) и деления на объем пробы (25 мл) в соответствии с (6.1) или (6.2)

V_{std} = добавленный объем стандарта (3.11.1) (0,5 мл)

V_{samp} = объем пробы, используемый в (6.1) или (6.2), V_{samp} = 25 мл.

C_{std} = концентрация стандарта (3.11.1)

Пример расчета:

(1) для образца, приготовленного в соответствии с (6.2) и измеренного в соответствии с (7.2)

DF = 1

$$C_a = \frac{V_{std} \times C_{std}}{V_{samp}} = \frac{0{,}5 \text{ мл} \times 100 \text{ мг/л}}{25 \text{ мл}} = 2 \text{мг/л}$$

ΔE = 19,6 мВ
S = -58,342

$$C_f = DF \times Ca \times \frac{1}{((anti\log \Delta E/\mathrm{S}) - 1)}$$

$$C_f = 1 \times 2 \text{мг/л} \times \frac{1}{((anti\log 19.6/58.342) - 1)}$$

$$C_f = 1 \times 2 \text{мг/л} \times 0.856 = 1.71 \text{ мг/л фтора}$$

(2) для образца, приготовленного в соответствии с (7.2.2) и измеренного в соответствии с (7.2)

DF = 2

$$C_a = \frac{V_{std} \times C_{std}}{V_{samp}} = \frac{0{,}5 \text{ мл} \times 100 \text{ мг/л}}{25 \text{ мл}} = 2 \text{мг/л}$$

ΔE = 20,4 мВ
S = -55,937

$$C_f = DF \times Ca \times \frac{1}{((anti\log \Delta E/\mathrm{S}) - 1)}$$

$$C_f = 2 \times 2 \text{мг/л} \times \frac{1}{((anti\log 20.4/55.937) - 1)}$$

$$C_f = 2 \times 2 \text{мг/л} \times 0.760 = 3.04 \text{ мг/л фтора}$$

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТОЧНОСТИ МЕТОДА

Детали межлабораторного исследования приведены в Приложении B. Показатель Horrat (HoR) колеблется от 0,30 до 0,97 и указывает на очень хорошую воспроизводимость результатов испытаний всех участников.

Результаты статистических расчетов приведены в Приложении B, таблица 2.
Стандартное отклонение повторяемости (RDS_r) колеблется в пределах от 1,94% до 4,88%. Стандартное отклонение воспроизводимости (RDS_R) колеблется в пределах от 4,15% до 18,40%. Средний процент восстановления колеблется в пределах от 99,8% до 100,3% от среднего целевого значения.

10. УПРАВЛЕНИЕ КАЧЕСТВОМ

10.1 Стандартный раствор с концентрацией 1,0 мг/л (3.11.2) анализируют в начале и в конце каждой серии измерений. Результаты должны составлять 1,0 ± 0,1 мг/л.

10.2 Перед каждой серией измерений анализируют пустой образец (3.12), а также отдельно перегруженное вино в рамках внутреннего контроля качества (ВКК) (3.13). Контрольная проба не должна превышать 0,0 мг/л ± 0,1 мг/л., а показатель CQI не должен превышать 1,0 мг/л ± 0,2 мг/л.

Приложение A

Библиография

1. AOAC International, AOAC Official Methods Program, Associate Referee's
   Manual On Development, Study, Review, and Approval Process,1997

2. Postel, W.; Prasch, E., Wein-Wissenschoft, (1975) 30 (6), 320-326

3. Office International de la Vigne et du Vin, Compendium of International Methods of Wine Analysis, 255-257

4. Gil Armentia, J. M.; Arranz, J. F.; Barrio, R. J.; Arranz, A., Anales de Bromatologia, (1988) 40 (1) 71-77

5. Gran, G; Analyst (1952) 77, 661

6. Corning fluoride ion selective electrode - Instruction Manual, 1994

7. Corning Instruction Manual pH/ion analyzer 455, 109121-1 Rev. A, 11/96

8. Horwitz,W.; Albert, R.; Journal of the Association of Official Analytical Chemists, (1991) 74 (5) 718

Приложение B

Межлабораторное исследование

ВАЛИДАЦИЯ ФТОРИД-ИОН-СЕЛЕКТИВНОГО ЭЛЕКТРОДА, СТАНДАРТНЫЙ МЕТОД ДОБАВЛЕНИЯ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФТОРИДА В ВИНАХ

B.1 Введение

В настоящем приложении описана валидация путем совместных испытаний фторид-ион-селективного электрода, а также стандартного метода добавления для измерения содержания фторида в винах. В совместном испытании приняли участие в общей сложности двенадцать человек, шесть европейцев и шесть американцев. Совместное исследование проводилось с использованием протокола Юдена AOAC, (Ассоциация химиков-аналитиков, состоящих на государственной службе).

B.2 Участники исследования

В исследовании приняли участие двенадвать лабораторий из Австрии, Франции, Германии, Испании и США, в том числе: BATF Alcohol and Tobacco Laboratory—Alcohol Section, Сан-Франциско, Уолнат-Крик, штат Калифорния, США; BATF, National Laboratory Ctr., Роквилл, штат Мэриленд, США; Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz, Берлин, Германия; Canandaigua Winery, Мадера, штат Калифорния, США; CIVC, Эперне, Франция; E. & J. Gallo Winery-Analytical Services Laboratory, Модесто, штат Калифорния, США; E. & J. Gallo Winery-Technical Analytical Services Laboratory, Модесто, штат Калифорния, США; ETS Labs, Сейнт Хелена, штат Калифорния, США; Höhere Bundeslehranstalt & Bundesamt für Wein und Obstbau, Клостернойбург, Австрия; Institut Catala de la Vinya i el Vi, Вилафранка-дель-Пендес (Барселона), Испания; Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Мадрид, Испания; and Sutter Home Winery, Сейнт Хелена, штат Калифорния, США.

B.3 Пробы, использованные в исследовании

Пробы, использованные в исследовании, приведены в Приложении I. В качестве проб были использованы двенадцать образцов вин (шесть пар Юдена, состоящих из трех красных вин и трех белых вин).

Проба	Описание
1	Белое вино без фортификации (всего 0,6 мг/л F-)
2	Белое вино, обогащенное 0,3 мг/л (всего 0,9 мг/л F-)
3	Белое вино, обогащенное 0,9 мг/л (всего 1,5 мг/л F-)
4	Белое вино, обогащенное 1,2 мг/л (всего 1,8 мг/л F-)
5	Белое вино, обогащенное 1,4 мг/л (всего 2,0 мг/л F-)
6	Белое вино, обогащенное 1,7 мг/л (всего 2,3 мг/л F-)
7	Красное вино без фортификации (всего 0,2 мг/л F-)
8	Красное вино, обогащенное 0,3 мг/л (всего 0,5 мг/л F-)
9	Красное вино, обогащенное 0,8 мг/л (всего 1,0 мг/л F-)
10	Красное вино, обогащенное 1.1 мг/л (всего 1,3 мг/л F-)
11	Красное вино, обогащенное 2,5 мг/л (всего 2,7 мг/л F-)
12	Красное вино, обогащенное 2,8 мг/л (всего 3,0 мг/л F-)

8.4 Результаты

Сводка результатов, полученных двенадцатью лабораториями, представлена в таблице I. Трудности с анализом не были выявлены ни у одной из лабораторий.

Результаты одной пары Юдена у одной из лабораторий были расценены как отклонение в соответствии с критерием Кохрана. Эти результаты отмечены[(c)] в таблице I и учитывались в статистическом анализе.

Таблица 1

Совместные данные по определению фторидов в винах с применением фторид-селективного электрода, стандартное добавление[a]

Лаборатория	Белое вино						Красное вино					
	Пара 1[b]		Пара 2[b]		Пара 3[b]		Пара 4[b]		Пара 5[b]		Пара 6[b]	
№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0,55	0,80	1,33	1,56	1,86	2,24	0,19	0,45	0,89	1,17	2,54	2,77
2	0,52	0,81	1,39	1,64	1,86	2,31	0,19	0,46	0,92	1,20	2,58	2,77
3	0,52	0,81	1,40	1,70	1,92	2,25	0,14	0,42	0,96	1,22	2,64	2,95
4	0,62	0,98	1,48	1,64	1,85	2.14	0,28	0,56	1,00	1,32	2,64	2,72
5	0,48	0,78	1,34	1,64	1,84	2.11	0,12	0,39	0,88	1,16	2,56	2,82
6	0,53	0,84	1,45	1,74	1,97	2.30	0,13	0,43	0,92	1,21	2,66	2,93
7	0,53	0,76	1,27	1,64	1,89	2.06	0,14	0,40	0,88	1.12	2,44	2,83
8	0,57	0,88	1,51	1,85	2.11	2,33	0,48c	0,48c	1.01	1,32	2,64	3.08
9	0,51	0,81	1,40	1,71	1,90	2.20	0,13	0,42	0,90	1.19	2,60	2,86
10	0,54	0,84	1,43	1,71	1,93	2,22	0,18	0,44	0,96	1,23	2,66	2,87
11	0,60	0,93	1,48	1,75	1,98	2,32	0,25	0,57	1,06	1,31	2,68	2,82
12	0,65	0,94	1,54	1,79	2,05	2,32	0,21	0,52	1,03	1,24	2,81	3.07
Кол-во измерений	12	12	12	12	12	12	11	11	12	12	12	12
Минимум	0,48	0,76	1,27	1,56	1,84	2.06	0,12	0,39	0,88	1.12	2,44	2,72
Максимум	0,65	0,98	1,54	1,85	2.11	2,33	0,28	0,57	1,06	1,32	2,81	3.08
Раззброс	0,17	0,22	0,27	0,29	0,27	0,27	0,16	0,18	0,18	0,20	0,37	0,36
Среднее	0,55	0,85	1,42	1,70	1,93	2,23	0,18	0,46	0,95	1,22	2,62	2,87
Медиана	0,54	0,83	1,42	1,71	1,91	2,25	0,18	0,44	0,94	1,22	2,64	2,85
Стандарное отклонение	0,050	0,069	0,079	0,079	0,084	0,091	0,052	0,063	0,061	0,065	0,090	0,114

[c] Значение исключено из статистического анализа в соответствии с критерием Кохрена

[a] Единицы: мг фторида/л.

[б] Пары Юдена

Таблица 2

Статистические данные совместного исследования по анализу содержания фторидов в винах с помощью фторидселективного ионного электрода методом стандартного добавления

СТАТИСТИКА	**Белое вино**			**Красное вино**		
	Пара 1	**Пара 2**	**Пара 3**	**Пара 4**	**Пара 5**	**Пара 6**
Общее количество лабораторий	12	12	12	11д	12	12
Количество «повторений» на одну лабораторию	2	2	2	2	2	2
Среднее значение (раздельные уровни)	0,55 0,85	1,42 1,70	1,93 2,23	0,18 0,46	0,95 1,22	2,62 2,87
Дисперсия повторяемости	0,0006	0,0015	0,0026	0,0002	0,0005	0,0049
Стандартное отклонение повторяемости	0,0235	0,0382	0,5106	0,0156	0,0211	0,0703
Относительное стандартное отклонение RSDr, повторяемость	3,35 %	2,45 %	2,45 %	4,88 %	1,94 %	2,55 %
Дисперсия воспроизводимости	0,0039	0,0070	0,0089	0,0034	0,0042	0,0130
Стандартное отклонение воспроизводимости	0,0625	0,0835	0,0945	0,0587	0,0647	0,1141
Относительное стандартное отклонение RSDR, воспроизводимость	8,92 %	5,36 %	4,54 %	18,39 %	5,95 %	4,15 %
С учетом критерия Горвица (RSDR)	16,88	14,97	14.33	19.00	15.80	13,74
Значение HORRAT HoR(RSDR(измеренное)/RSDR(Horwitz))	0,53	0,36	0,32	0,97	0,38	0,30
Средний % восстановления	93,1	94,6	96,7	91,0	94,4	96,4

[d] Одна лабораторная пара была исключена из выборки согласно критерию Кохрена.

Метод OIV-MA-AS321-04 Метод IV-го типа

Общий фосфор

1. **Сущность метода**

После окисления азотом, озоления и растворения в соляной кислоте фосфорную кислоту определяют колориметрически в виде желтого фосфованадомолибдатного комплекса.

2. **Аппаратура**
   - 2.1 Кипящая водяная баня 100°C
   - 2.2 Нагревательная плита
   - 2.3 Электропечь с регулируемой температурой
   - 2.4 Спектрофотометр для измерения поглощения в диапазоне волн от 300 до 700 нм
3. **Реактивы**
   - 3.1 Азотная кислота (ρ_{20} = 1,39 г/мл).
   - 3.2 Соляная кислота, прибл. 3 М; соляная кислота (ρ_{20} = 1,15-1,18 г/мл), разведенная на 1/4 водой.
   - 3.3 Ванадомолибдатный реагент:

Раствор А: 40 г молибдата аммония $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ растворяют в 400 мл воды.
Раствор В: 1 г ванадата аммония, NH_4VO_3, растворяют в 300 мл воды и 200 мл азотной кислоты (ρ_{20} = 1,39 г/л) (3.1), затем оставляют остывать.
Ванадомолибдатный реактив: раствор Б, затем раствор А помещают в колбу объемом 1 л и доводят водой до метки. Реагент пригоден к использованию в течение 8 дней после приготовления.

- 3.4 Раствор P_2O_5, 0,1 г/л.

Раствор P_2O_5 с концентрацией 1 г/л готовят, растворив 2,454 г гидрофосфата калия K_2HPO_4 в 1 литре воды. Разбавляют в отношении 1/10 (об./об.).

4. **Проведение исследования**

- 4.1 *Озоление*

5 мл* вина или сусла помещают в чашку из платины или кремнезема и выпаривают на кипящей водяной бане (2.1). После почти полного высыхания остатка добавляют 1 мл азотной кислоты (3.1), помещают чашку на нагревательную плиту (2.2) на 1 час, затем в печь (2.3) при 600-650 oC, пока зола не станет белой.

4.2 *Определение*

К золе добавляют 5 мл соляной кислоты концентрацией приблизительно 3 M (3.2) и переносят раствор в мерную колбу объемом 100 мл. Чашку промывают 50 мл дистиллированной воды и выливают полученную смесь в колбу. Добавляют ровно 25 мл реактива ванадомолибдата, перемешивают и оставляют на 15–20 мин. для проявления цвета. Уровень поглощения определяют при 400 нм.

Параллельно готовят стандартные растворы. В пять мерных колб объемом 100 мл помещают по 5, 10, 15, 20 и 25 мл соответственно раствор P_2O_5 с концентрацией 0,1 г/л (3.4). Доводят до 50 мл дистиллированной водой и добавляют 25 мл реагента ванадомолибдата. Оставляют на то же время, что и образцы, для проявления цвета. Доводят до метки водой и определяют оптическую плотность при 400 нм.

В рамках соблюдения наилучшего диапазона поглощения не следует доводить до нуля дистиллированной водой, необходимо установить степень отклонения спектрофотометра-гальванометра на значение поглощеня в соответствии с выбранным уровнем концентрации.

5. Выражение результатов

5.1 *Расчеты*

Общее содержание фосфора, выраженное в миллиграммах на литр фосфорного ангидрида, P_2O_5, вычисляется путем ввода значения оптической плотности образца вина на калибровочном графике и интерполяции уровня концентрации общего фосфора.

Общее содержание фосфора выражается в миллиграммах на литр P2O5 с точностью до ближайшего целого числа.

БИБЛИОГРАФИЯ

* Объем образца 5 мл подходит для содержания P_2O_5 от 100 до 500 мг/л.
Вне указанных пределов концентрации объем пробы следует уменьшить или увеличить.

A.F.N.O.R., Norme U, 42-246, Tour Europe, Paris.
SUDRAUD P., *Bull. O.I.V.*, 1969, 462-463, 933.

Метод OIV-MA-AS321-05A Метод II-го типа

Сульфаты

1. Сущность метода

Настоящий метод заключается в гравиметрическом определении после осаждения сульфата бария. Осажденный при этом фосфат бария удаляют промывкой осадка в соляной кислоте.

В случае сусла или вина, богатых диоксидом серы, рекомендуется предварительная десульфитация путем кипячения в герметичном сосуде.

2. Метод

2.1 *Реактивы*

2.1.1 Соляная кислота, 2 М.

2.1.2 Раствор хлорида бария, $BaCl_2.2H_2O$, 200 г/л.

2.2 *Проведение исследования*

2.2.1 Общая процедура:

В центрифужную пробирку объемом 50 мл помещают 40 мл анализируемой пробы, добавляют 2 мл соляной кислоты, 2 М (2.1.1), и 2 мл раствора хлорида бария, 200 г/л (2.1.2). Перемешивают при помощи стеклянной мешалки; промывают мешалку небольшим количеством дистиллированной воды и оставляют на 5 мин. Центрифугируют в течение пяти минут, затем осторожно сливают надосадочную жидкость.

Осадок сульфата бария промывают следующим образом: добавляют 10 мл 2 М соляной кислоты (2.1.1), помещают осадок в суспензию и центрифугируют в течение 5 мин, затем осторожно сливают надосадочную жидкость. Процедуру промывки повторяют дважды, каждый раз используя 15 мл дистиллированной воды.

Количественно переносят осадок с дистиллированной водой в тарированную платиновую капсулу и помещают на водяную баню при 100°C до полного испарения. Высушенный осадок несколько раз кратковременно прокаливают над пламенем до получения белого остатка. Дают остыть в эксикаторе и взвешивают.

Пусть m = масса полученного сульфата бария в миллиграммах.

2.2.2 Особая процедура: сульфитированное сусло и вино с высоким содержанием диоксида серы.

Удаление диоксида серы.

25 мл воды и 1 мл концентрированной соляной кислоты (ρ20=1,15–1,18 г/мл) отмеряют в коническую колбу объемом 500 мл, снабженную капельной воронкой и выпускной трубкой. Раствор доводят до кипения для удаления воздуха и вводят 100 мл вина через капельную воронку. Продолжают кипятить до тех пор, пока объем жидкости в колбе не уменьшится примерно до 75 мл, и количественно переносят после охлаждения в мерную колбу на 100 мл. Доводят до отметки водой. Уровень сульфата определяют в пробе объемом 40 мл, как указано в 2.2.1.

2.3. Выражение результатов

2.3.1 Расчеты:

Уровень содержания сульфата, выраженный в миллиграммах на литр сульфата калия, K_2SO_4, рассчитан следующим образом:

18,67 x *m*

Содержание сульфата в сусле или вине выражается в миллиграммах на литр сульфата калия с точностью до целого числа.

2.3.2 Повторяемость (r):

до 1000 мг/л: $r = 27$ мг/л
прибл. 1500 мг/л: $r = 41$ мг/л

2.3.3 Воспроизводимость (R):

до 1000 мг/л: R = 51 мг/л
прибл. 1500 мг/л: R = 81 мг/л

БИБЛИОГРАФИЯ

DEIBNER L , BÉNARD P., *Ind. alim. agric.,* 1954, **71**, nº1, 23; nº5, 427; 1955, **72**, nº9-10, 565 et nº11, 673.

DEIBNER L., *Rév. ferm. ind. alim.,* 1959, **14** nº5, 179 et nº6, 227.

BLAREZ Ch., *Vins et spiritueux,* 1908, 149, Maloine éd., Paris.

DER HEIDE X. von, SCHITTHENNER F., *Der Wein,* 1922, 320, Vieweg & Sohn Verlag, Braunschweig.

JAULMES P., *Analyse des vins,* 1924, 73, Dubois et Poulain, éd., Montpellier; 2e édition, 1951, 112.

SIMONEAU G., *Étude sur les moûts concentrés de raisins,* 1946, Thèse pharm., Montpellier, 49.
RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., *Analyse et contrôle des vins,* 1947, 244, Ch. Béranger éd., Paris-Liège.
FROLOV-BAGREEV A., AGABALIANTZ G., *Chimie du vin,* 1951, 369, Moscou, Laboratoire de chimie de l'État de Würzburg (Allemagne), *F.V., O.I.V.,* 1969, no321.

Метод OIV-MA-AS321-05B

Сульфаты

Метод быстрого тестирования

Вина классифицируются на несколько категорий с использованием так называемого метода «ограничения», основанного на осаждении сульфата бария с помощью титранта с ионами бария.

МЕТОД ИСКЛЮЧЕН

Метод OIV-MA-AS322-01 Метод IV-го типа

Аммоний

1. Сущность метода

Настоящий метод заключается в удержании катиона аммония на слабом катионите, элюировании кислым раствором, отгонке элюента и определении уровня аммиака в дистилляте титрованием стандартизированным раствором соляной кислоты.

2. Аппаратура

2.1 *Колонка с катионообменной смолой*

Бюретка объемом 50 мл со стеклянным краном, снабженным пробкой из стекловаты, содержащей 25 г слабой катионообменной смолы (например, Amberlite IR-50, 80-100 меш).
Промывают попеременно 1 М раствором гидроксида натрия и 1 М раствором соляной кислоты. Смолу промывают дистиллированной водой до получения отрицательной реакции хлорид-иона с нитратом серебра. 50 мл нейтрального буфера медленно пропускают через стеклянную колонку, промывают дистиллированной водой до тех пор, пока фосфаты не начнут элюироваться, что определяют с помощью насыщенного раствора ацетата свинца.

2.2 *Дистилляционный прибор*

Прибор, описанный в главе *о крепости алкоголя* 3.1.
Конденсат переносят в коническую колбу через вытянутую трубку, касающуюся дна сосуда.
В качестве альтернативы возможно использовать аппарат для перегонки с водяным паром, описанный в главе *о летучих кислотах* 4.1, или другой аппарат по проверке чистоты реактивов, подходящий для следующих экспериментов:

a) 40-45 мл 30 % раствора гидроксида натрия (об./об.), 50 мл воды и 50 мл одномолярной соляной кислоты помещают в колбу для перегонки. Отгоняют половину объема и собирают дистиллят в 30 мл раствора борной кислоты концентрацией 40 г/л, к которому добавляют 5 капель метилового красного. Доводят цвет до розового, добавляя 0,1 мл 0,1 М соляной

кислоты.

b) Испытание (аналогичное описанному в пункте a) проводят с использованием 10 мл 0,05-литрового раствора сульфата аммония, содержащего 3,55 г/л безводного сульфата аммония, $(NH_4)_2SO_4$. В этом случае для изменения цвета индикатора необходимо использовать от 10 до 10,1 мл 0,1 М соляной кислоты.

3. Реактивы

3.1 Раствор соляной кислоты, 1 М.

3.2 Гидроксид натрия, 1 М.

3.3 Нейтральный раствор для промывки смолы:

гидрогенфосфат натрия Na2PO4.12H2O..... 15 г
дигидрогенфосфат калия KH2KO4 ..... 3,35 г
вода ..... 1000 мл
Уровень pH должен составлять 7 ± 0,2.

3.4 Раствор гидроксида натрия, 30% (м/м), p = 1,33 г/мл.

3.5 Раствор соляной кислоты, 0,1 М.

3.6 Раствор фенолфталеина, 1% (масс./об.), в нейтральном этаноле, 96% (об./об.)

3.7 Раствор бромкрезолового зеленого, 1% (масс./об.):

бромкрезоловый зеленый .....1 грамм
растворить в 0,1 М растворе гидроксида натрия, 14 мл
вода ..... 100 мл

3.8 Раствор метилового красного этанола/воды, 0,2% (об./об.):

метиловый красный ..... 0,2 г
спирт, 95% (об.)..... 60 мл
вода ..... 100 мл

3.9 Раствор борной кислоты

Борная кислота ..... 40 г
Вода ..... 1000 мл
В борной кислоте обычно содержится небольшое количество щелочных примесей, для устранения которых в раствор добавляют 5 капель индикатора и доводят до розового цвета несколькими каплями 0,1 М соляной кислоты (не более 1 мл).

4. Проведение исследования

50 мл образца для анализа переносят в химический стакан объемом 250 мл. Добавляют количество одномолярного гидроксида натрия, равное половине (n-0,5) мл, где n - объем раствора гидроксида натрия, 0,1 М, использованного при титровании общей кислотности на 10 мл вина. Полученную смесь пропускают через катионообменную колонку (2.1) со скоростью одна капля каждые две секунды. Уровень pH элюента должен находиться в пределах от 4 до 5. Колонку промывают 50 мл дистиллированной воды с той же скоростью потока.

Аммоний и другие катионы количественно удерживаются на колонке. Амиды, олигопептиды и почти все аминокислоты элюируются промывкой.

Катионы, оставшиеся на смоле, элюируют 50 мл одномолярной соляной кислоты (3.1) и промывают 50 мл дистиллированной воды. Элюат и промывную воду объединяют в 1-литровой круглодонной колбе для перегонки.

Добавляют одну каплю фенолфталеина, 1% (масс./об.), и достаточное количество 30%-ного раствора едкого натра (масс./об.) (3.4), чтобы получить истинно щелочную реакцию, постоянно охлаждая колбу во время добавления.

Перегоняют примерно половину объема жидкости из перегонной колбы в 30 мл 4% борной кислоты (м/об) (3.9).

Дистиллят титруют 0,1 М соляной кислотой (3.5) в присутствии бромкрезолового зеленого или метилового красного. Уровень объема использованной соляной кислоты (n) записывают.

5. Выражение результатов

Содержание ионов аммония (NH_4) выражают в миллиграммах на литр с точностью до целого числа.

5.1 *Расчеты*

Содержание ионов аммония, выраженное в миллиграммах на литр, составляет:

$36 \times n$

При анализе вин с низким содержанием аммония определение проводят на 100 мл вина. В этом случае количество аммония определяют по формуле:

$18 \times n$

БИБЛИОГРАФИЯ

Обычный метод:

JAULMES P., *Analyse des vins,* 1951, 220, Montpellier
KOURAKOU Mme S., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1960, **53**, 337.

Метод OIV-MA-AS322-02A Метод II-го типа

Калий

1. Сущность метода

Настоящий метод служит для определения уровня калия непосредственно в разбавленных винах при помощи атомно-абсорбционной спектрофотометрии после добавления хлорида цезия для подавления ионизации калия.

2 Метод

2.1 *Аппаратура*

- Атомно-абсорбционный спектрофотометр с воздушно-ацетиленовой горелкой.
- Калиевая лампа с полым катодом

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Раствор, содержащий 1 г калия на литр.

Используют стандартный коммерческий раствор, содержащий 1 г калия на литр. Данный раствор можно приготовить, растворив 4,813 г гидротартрата калия ($C_4H_5KO_6$) в дистиллированной воде и доведя объем до 1 литра водой.

2.2.2 Матричное (модельное) решение:

моногидрат лимонной кислоты .....3,5 грамм
сахароза .....1,5 грамм
глицерин.....5,0 грамм
безводный хлорид кальция ($CaCl_2$).....50 мг
безводный хлорид магния ($MgCl_2$) .....50 мг
абсолютный спирт.....50 мл
вода ..... 500 мл

2.2.3 Раствор хлорида цезия, содержащий 5% цезия:

6,33 г хлорида цезия CsCl растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

2.3 *Проведение исследования*

2.3.1 Подготовка образца

В мерную колбу объемом 50 мл при помощи пипетки переносят 2,5 мл вина (предварительно разбавленного с отношением 1/10),

2.3.2 Калибровка

По 5,0 мл матричного раствора вносят в каждую из пяти мерных колб объемом 100 мл и добавляют 0, 2,0, 4,0, 6,0 и 8,0 мл соответственно раствора калия с концентрацией 1 г/л (предварительно разбавленного с отношением 1/10). В

каждую колбу добавляют по 2 мл раствора хлорида цезия и доводят до 100 мл дистиллированной водой.

Стандартные растворы содержат 0, 2, 4, 6 и 8 мг калия на литр соответственно и каждый раствор содержит 1 г цезия на литр. Растворы хранят в пластиковых бутылках.

2.3.3 Определение

Длину волны устнавливают на 769,9 нм. Обнуляют шкалу абсорбции, используя нулевой стандартный раствор (2.3.2). Аспирируют разбавленное вино (2.3.1) непосредственно в спектрофотометр, а затем последовательно стандартные растворы (2.3.2). Оптическую плотность для каждого раствора записывают и повторяют процедуру.

2.4 *Выражение результатов*

2.4.1 Метод расчета

Для расчета выстраивают график, показывающий изменение оптической плотности в зависимости от концентрации калия в стандартных растворах.

На график наносят среднюю абсорбцию, полученную с разбавленным вином, и определяют концентрацию калия C в миллиграммах на литр.

Концентрация калия, выраженная в миллиграммах на литр вина с точностью до целого числа, равна F x C, где F — коэффициент разбавления (здесь 200).

2.4.2 Повторяемость (r): p = 35 мг/л.

2.4.3 Воспроизводимость (R): R = 66 мг/л.

2.4.4 Другие способы выражения результатов

- В миллиэквивалентах на литр: 0,0256 x F x C.
- В мг гидротартрата калия на литр: 4,813 x F x C

Метод OIV-MA-AS322-02B Метод III-го типа

Калий

1. Сущность метода

Настоящий метод служит для определения уровня калия непосредственно в разбавленных винах при помощи пламенной фотометрии.

Примечание: Гравиметрическое определение тетрафенилбората калия, осажденного из раствора золы вина, является точным методом определения калия и описано в приложении.

2. Метод

2.1 *Аппаратура*

2.1.1 Пламенный фотометр, снабженный воздушно-бутановой смесью.

2.2 *Реактивны*

2.2.1 Эталонный раствор, содержащий 100 мг калия на литр

Абсолютный спирт	10 мл
Лимонная кислота $C_6H_8O_7$, H_2O	700 мг
Сахароза	300 мг
Глицерин	1000 мг
Хлорид натрия, NaCl	50,8 мг
Безводный хлорид кальция, $CaCl_2$	10 мг
Безводный гидротартрат калия	481,3 мг
Вода	1000 мл

Гидротартрат калия растворяют в 500 мл предельно горячей дистиллированной воды, полученный раствор смешивают с 400 мл дистиллированной воды, в которой уже растворены другие химические вещества, и доводят до одного литра.

2.2.2 Разбавляющий раствор

Абсолютный спирт	10 мл
Лимонная кислота безводная	700 мг
Сахароза	300 мг
Глицерин	1000 мг
Хлорид натрия, NaCl	50,8 мг

Безводный хлорид кальция, $CaCl_2$……10 мг
Безводный хлорид магния, $MgCl_2$…….10 мг
Винная кислота……383 мг
Вода……...1000 мл

Растворы сохраняют в пластиковых бутылках, добавив две капли аллилизотиоцианата (3-изотиоцианато-1-пропен; $CH_2=CHCH_2NCS$).

2.3 *Проведение исследования*

2.3.1 Калибровка

25, 50, 75 и 100 мл эталонного раствора помещают в набор из четырех мерных колб объемом 100 мл и доводят до 100 мл разбавляющим раствором для получения растворов, содержащих 25, 50, 75 и 100 мг калия на литр соответственно.

2.3.2 Определение

Измерения проводят при 766 нм. При помощи дистиллированной воды регулируют 100% передачу. Последовательно распыляют стандартные растворы непосредственно в горелку фотометра, затем вино, разбавленное 1/10 дистиллированной водой, и записывают значения. При необходимости уже разбавленное 1/10 вино дополнительно разбавляют раствором для разбавления (2.2.2).

2.4 *Выражение результатов*

2.4.1 Метод расчета

Для расчета выстраивают график изменения процентного пропускания в зависимости от концентрации калия в стандартных растворах. Записывают уровень пропускания, полученный для образца разбавленного вина, на графике и определяют соответствующую концентрацию калия C.

Концентрация калия в мг калия на литр с точностью до целого числа составляет:

$$F \times C$$

где F – коэффициент разбавления.

2.4.2 Повторяемость (r): p = 17 мг/л.

2.4.3 Воспроизводимость (R): R = 66 мг/л.

2.4.4 Другие способы выражения результатов:

- В миллиэквивалентах на литр: 0,0256 x F x C.
- В мг гидротартрата калия на литр: 4,813 x F x C.

Метод OIV-MA-AS322-02C

Калий
(Резолюция Oeno 377/2009)

Метод гравиметрического определения уровня калия с использованием тетрафенилбората натрия

Материал исключен

Метод OIV-MA-AS322-03A Метод II-го типа

Натрий

1. Сущность метода

Настоящий метод служит для определения уровня натрия непосредственно в винах при помощи атомно-абсорбционной спектрофотометрии после добавления хлорида цезия для подавления ионизации натрия.

2. Метод

2.1 *Аппаратура*

- Атомно-абсорбционный спектрофотометр с воздушно-ацетиленовой горелкой.
- Натриевая лампа с полым катодом.

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Раствор, содержащий 1 г натрия на литр:

Предпочтительно использование коммерческого стандартного раствора, содержащего 1 г натрия на литр.

Альтернативный раствор можно приготовить, растворив 2,542 г безводного хлорида натрия (NaCl) в дистиллированной воде и доведя до объем 1 литр.

Раствор хранят в пластиковой бутылке.

2.2.2 Матричное (модельное) решение:

Моногидрат лимонной кислоты (C6H8O7.H2O)……. 3,5 г
Сахароза ..... 1,5 грамм
Глицерин ..... 5,0 грамм
Безводный хлорид кальция (CaCl2) ..... 50 мг
Безводный хлорид магния (MgCl2)..... 50 мг
Абсолютный спирт ..... 50 мл
Деионизированная вода..... 500 мл

2.2.3 Раствор хлорида цезия, содержащий 5% цезия

6,330 г хлорида цезия CsCl растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

2.3 *Проведение исследования*

2.3.1 Подготовка образца

2,5 мл вина отбирают пипеткой в мерную колбу объемом 50 мл, добавляют 1 мл раствора хлорида цезия (2.2.3) и доводят до метки дистиллированной водой.

2.3.2 Калибровка

По 5,0 мл матричного раствора помещают в каждую из пяти мерных колб объемом 100 мл и добавляют соответственно 0, 2,5, 5,0, 7,5 и 10 мл
1 г/л раствора натрия 1:100. В каждую колбу добавляют по 2 мл раствора хлорида цезия (2.2.3) и доводят до 100 мл дистиллированной водой.
Стандартные растворы, приготовленные таким образом, содержат 0,25, 0,50, 0,75 и 1,00 мг натрия на литр соответственно, а каждый содержит 1 г цезия на литр. Растворы хранят в пластиковых бутылях.

2.3.3 Определение

Длину волны поглощения устанавливают на уровень 589,0 нм. Шкалу абсорбции обнуляют, используя нулевой стандартный раствор. Разбавленное вино (2.3.1), а затем стандартные растворы (2.3.2) аспирируют непосредственно в спектрофотометр. Уровень каждой абсорбции записывают и каждое измерение повторяют.

2.4 *Выражение результатов*

2.4.1 Метод расчета

Для расчета выстраивают график зависимости измеренной оптической плотности от концентрации натрия в стандартных растворах.
Уровень поглощения, полученный с разбавленным вином, записывают на кривую и определяют концентрацию натрия C в миллиграммах на литр.
Концентрация натрия в миллиграммах на литр вина будет рассчитываться по формуле F x C с точностью до ближайшего целого числа, где F — коэффициент разбавления.

2.4.2. Повторяемость (r): $r = 1 + 0{,}024\ x_i$ мг/л.
x_i = концентрация натрия в образце в мг/л.

2.4.3. Воспроизводимость (R):$p = 2{,}5 + 0{,}05\ x_i$ мг/л.
x_i = концентрация натрия в образце в мг/л.

Метод OIV-MA-AS322-03B Метод III-го типа

Натрий

1.Сущность метода

Настоящий метод служит для определения уровня натрия непосредственно в разбавленных винах (не менее 1 мл:10 мл) при помощи пламенной фотометрии.

2.Метод

2.1 *Аппаратура*

2.1.1. Пламенный фотометр, снабженный воздушно-бутановой смесью.

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Эталонный раствор, содержащий 20 мг натрия на литр

Абсолютный спирт .....10 мл
Моногидрат лимонной кислоты (C6H8O7 H2O)...700 мг
сахароза.....300 мг
глицерин.....1000 мг
гидротартрат калия .....481,3 мг
Безводный хлорид кальция, CaCl2.....10 мг
Безводный хлорид магния, MgCl2 .....10 мг
Сухой хлорид натрия, NaCl .....50,84 мг
Вода .....1000 мл

2.2.2 Разбавляющий раствор

Абсолютный спирт .....10 мл
Моногидрат лимонной кислоты (C6H8O7.H2O)…700 мг
сахароза.....300 мг
глицерин.....1000 мг
гидротартрат калия .....481,3 мг
Безводный хлорид кальция, CaCl2.....10 мг
Безводный хлорид магния, MgCl2 .....10 мг
Вода .....1000 мл

Для приготовления 2.2.1 и 2.2.2 гидротартрат калия растворяют примерно в 500 мл предельно горячей дистиллированной воды, затем

смешивают с 400 мл дистиллированной воды, в которой уже растворены другие химические вещества, и доводят до одного литра. Растворы сохраняют в пластиковых бутылях, добавляя в каждую по две капли аллилизотиоцианата.

2.3 *Проведение исследования*

2.3.1 Калибровка

5, 10, 15, 20 и 25 мл эталонного раствора помещают в каждую из пяти мерных колб объемом 100 мл и доводят раствором до 100 мл, чтобы получить растворы, содержащие 1, 2, 3, 4 и 5 мг натрия на литр соответственно.

2.3.2 Определение

Измерения проводят при 589,0 нм. При помощи дистиллированной воды регулируют 100% пропускание. В фотометр последовательно аспирируют стандартные растворы, а затем вино, разбавленное 1:10 дистиллированной водой, и отмечают процент пропускания каждого из них. При необходимости вино может быть дополнительно разбавлено раствором для разведения.

2.4 *Выражение результатов*

2.4.1 Метод расчета

Для расчета выстраивают график зависимости коэффициента пропускания в процентах от концентрации натрия в стандартных растворах. Уровень пропускания, полученный для разбавленной пробы вина, записывают на кривую и отмечают уровень концентрации натрия в вине.

Концентрация натрия в мг натрия на литр рассчитывается по следующей формуле: F x C

где F – коэффициент разбавления.

2.4.2 Повторяемость (r)

r =1,4 мг/л (кроме ликерного вина)

r =2,0 мг/л для ликерного вина.

2.4.3. Воспроизводимость (R)

R =4,7 + 0,08 x_i мг/л.

x_i = концентрация натрия в образце в мг/л.

Метод OIV-MA-AS322-04 Метод II-го типа

Кальций

1. Сущность метода

Настоящий метод служит для определения уровня кальция непосредственно в разбавленных винах при помощи атомно-абсорбционной спектрофотометрии после добавления агента, подавляющего ионизацию.

2. Аппаратура

2.1 Атомно-абсорбционный спектрофотометр с воздушно-ацетиленовой горелкой.

2.2 Кальциевая лампа с полым катодом.

3. Реактивы

3.1 Стандартный раствор кальция 1 г/л. Предпочтительно использование стандартного коммерческого раствора кальция, 1 г/л.

Альтернативный раствор можно приготовить, растворив 2,5 г карбоната кальция, CaCO3, в достаточном количестве соляной кислоты (концентрированная соляная кислота, разбавленная 1:10), чтобы полностью растворить его, и доведя до одного литра дистиллированной водой.

3.2 Разбавленный стандартный раствор кальция, 50 мг/л

Примечание: растворы кальция следует хранить в пластиковых контейнерах.

3.3 Разбавленный стандартный раствор лантана, 50 г/л

13,369 г хлорида лантана $LaCl_3.7H_2O$ растворяют в дистиллированной воде; добавляют 1 мл разбавленной соляной кислоты (концентрированная соляная кислота, разбавленная 1/10) и доводят до 100 мл дистиллированной водой.

4. Проведение исследования

4.1 *Подготовка образца*

1 мл вина и 2 мл раствора хлорида лантана (3.3) помещают в мерную колбу объемом 20 мл и доводят до метки дистиллированной водой. Разбавленное вино содержит 5 г лантана на литр.

*Примечание:*Для сладких вин достаточно 5 г лантана на литр при условии, что разбавление снижает уровень содержания сахара до уровня менее 2,5 г/л. Для вин с более высокой концентрацией сахара концентрацию лантана следует увеличить до 10 г/л.

4.2 *Калибровка*

В каждую из пяти мерных колб объемом 100 мл помещают 0, 5, 10, 15 и 20 мл разбавленного стандартного раствора кальция (3.2), а затем 10 мл раствора хлорида лантана (3.3) и доводят до 100 мл дистиллированной водой. Приготовленные таким образом растворы содержат 0, 2,5, 5,0, 7,5 и 10 мг кальция на литр соответственно и по 5 г лантана на литр каждый. Растворы следует хранить в пластиковых бутылях.

4.3 *Определение*

Длину волны поглощения устанавливают на 422,7 нм. Шкалу абсорбции обнуляют, используя нулевой стандарт (4.2). В спектрофотометр аспирируют разбавленное вино, а затем последовательно пять стандартных растворов (4.2) и записывают оптическую плотность. Каждое измерение повторяют.

5. Выражение результатов

5.1 *Метод расчета*

Для расчета выстраивают график, показывающий изменение абсорбции в зависимости от концентрации кальция в стандартных растворах.

Среднее значение оптической плотности, полученное для образца разбавленного вина, записывают на графике и определяют его концентрацию кальция. Концентрация кальция в миллиграммах на литр вина с точностью до ближайшего целого числа определяется по формуле: $20 \times C$

5.2 *Повторяемость* ®

Концентрация <60 мг/л: r=2,7 мг/л.
Концентрация > 60 мг/л: r = 4 мг/л.

5.3 *Воспроизводимость* ®

$$R \text{ мг/л} = 0{,}114\ xi - 0{,}5.$$

где xi = концентрация в образце в мг/л.

Метод OIV-MA-AS322-05A Метод IV-го типа

,Железо

1. Сущность метода

Настоящий метод служит для определения уровня железа при помощи атомно-абсорбционной спектрофотомерии после надлежащего разбавления вина и удаления спирта.

2. Метод

2.1 *Аппаратура*

2.1.1 Ротационный испаритель с водяной баней, регулируемой термостатом.

2.1.2 Атомно-абсорбционный спектрофотометр с воздушно-ацетиленовой горелкой.

2.1.3 Железная лампа с полым катодом.

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Концентрированный стандартный раствор железа, содержащий 1 г Fe (III) на литр.

Используют стандартный коммерческий раствор, 1 г/л. Этот раствор можно приготовить, растворив 8,6341 г сульфата железа и аммония, $FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$ в дистиллированной воде, слегка подкисленной одномолярной соляной кислотой, доведя до одного литра.

2.2.2 Разводят стандартный раствор железа, содержащий 100 мг железа на литр.

2.3 Проведение исследования

2.3.1 *Подготовка образца*

Спирт удаляют из вина, уменьшив объем образца вдвое по сравнению с его первоначальным размером с помощью роторного испарителя (от 50 до 60 °C). Доводят до первоначального объема дистиллированной водой.

При необходимости перед анализом разбавляют дистиллированной водой.

2.3.2 *Калибровка*

В каждую из пяти мерных колб объемом 100 мл помещают по 1, 2, 3, 4 и 5 мл раствора, содержащего 100 мг железа на литр (2.2.2)

соответственно, и доводят дистиллированной водой до 100 мл. Приготовленные таким образом растворы содержат соответственно 1, 2, 3, 4 и 5 мг железа на литр. Растворы следует хранить в пластиковых бутылях.

2.3.3 *Определение*

Длину волны поглощения устанавливают на 248,3 нм. Шкалу поглощения обнуляют, используя дистиллированную воду. Разбавленный образец аспирируют непосредственно в спектрофотометр, а затем последовательно вводят пять стандартов (2.3.2). Значения абсорбции записывают. Каждое измерение повторяют.

2.4 *Выражение результатов*

2.4.1 *Метод расчета*

Для расчета выстраивают график зависимости оптической плотности от концентрации железа в стандартных растворах. Среднее значение абсорбции, полученное с разбавленным образцом вина, записывают на кривой и определяют его концентрацию железа.

Концентрация железа в миллиграммах на литр вина с точностью до одного десятичного знака определяется по формуле:

$$F \times C$$

где F – коэффициент разбавления.

Метод OIV-MA-AS322-05B Метод IV-го типа

Железо

1. Сущность метода

Настоящий метод служит для количественного определения уровня железа по образованию окрашенного ортофенантролинового комплекса в силу того, что после вываривания в 30% перекиси водорода общее железо в виде Fe (III) восстанавливается до Fe (II).

2. Метод

2.1 *Аппаратура*

2.1.1 Колба Кьельдаля, 100 мл.
2.1.2 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длине волны 508 нм.

2.2 *Реактивы*

2.2.1 Перекись водорода, H2O2, 30% (масс./об.), раствор, без содержания железа.
2.2.2 Соляная кислота, 1 М, без содержания железа.
2.2.3 Гидроксид аммония (ρ20 = 0,92 г/мл).
2.2.4 Зерна пемзы, предварительно обработанные кипящей соляной кислотой, разбавленной на ½, и промытые дистиллированной водой.
2.2.5 Раствор гидрохинона, 2,5%, подкисленный 1 мл концентрированной серной кислоты (ρ20 = 1,84 г/мл) на 100 мл раствора. Данный раствор следует хранить в темной бутылке в холодильнике и утилизировать при малейших признаках потемнения.
2.2.6 Раствор сульфита натрия, 20%, приготовленный из нейтрального безводного сульфита натрия.
2.2.7 Раствор ортофенантролина, $C_{12}H_8N_2$, 0,5%, в спирте, 96% об.
2.2.8 Раствор ацетата аммония, CH3COONH4, 20% (м/об).
2.2.9 Раствор Fe (III), содержащий 1 г железа на литр. Предпочтительно использование коммерческого раствора. В качестве альтернативы можно приготовить раствор Fe (III) с концентрацией 1000 мг/л путем растворения 8,6341 г сульфата железа и аммония FeNH4 (SO4)2.12H2O, в 100 мл соляной кислоты, 1 М, и доведения объема до одного литра соляной кислотой, 1 М.
2.2.10 Стандартный раствор железа, содержащий 100 миллиграммов железа на литр, разбавляют.

2.3 Проведение исследования

2.3.1 Минерализация

2.3.1.1 Для вин с уровнем содержания сахара менее 50 г/л

25 мл вина, 10 мл раствора перекиси водорода и несколько крупинок пемзы смешивают в колбе Кьельдаля объемом 100 мл. Смесь концентрируют до объема 2-3 мл путем нагревания. Дают остыть и добавляют достаточное количество гидроксида аммония, чтобы сделать остаток щелочным, таким образом осаждая гидроксиды, стараясь не смачивать стенки колбы.

После охлаждения осторожно добавляют соляную кислоту к щелочной жидкости для растворения выпавших в осадок гидроксидов и переносят полученный раствор в мерную колбу объемом 100 мл. Колбу Кьельдаля промывают соляной кислотой, соединяют растворы в мерной колбе и доводят до 100 мл.

2.3.1.2 Для сусла и вин с уровнем содержания сахара более 50 г/л

- Если уровень содержания сахара составляет от 50 до 200 г/л, образец вина объемом 25 мл обрабатывают 20 мл раствора перекиси водорода. Затем проводят процедуру из п. 2.3.1.1.
- Если уровень содержания сахара превышает 200 г/л, образцы вина или сусла разбавляют на 1/2 или, возможно, на 1/4 перед обработкой 20 мл раствора перекиси водорода. Затем проводят процедуру из п. 2.3.1.1.

2.3.2 Холостая проба

Холостую пробу проводят с дистиллированной водой, используя тот же объем раствора перекиси водорода, что и количество, используемое для минерализации, в соответствии с экспериментом из п. 2.3.1.1.

2.3.3 Определение

20 мл солянокислого раствора винного перевара и 20 мл раствора соляной кислоты, полученного в ходе «холостого эксперимента», помещают в две отдельные мерные колбы объемом 50 мл. Добавляют 2 мл раствора гидрохинона, 2 мл раствора сульфита и 1 мл орто-фенантролина. Дают постоять 15 минут, в течение которых Fe (III) восстанавливается до Fe (II). Затем добавляют 10 мл раствора ацетата аммония, доводят до 50 мл дистиллированной водой и встряхивают обе мерные колбы. Раствор, полученный в ходе пустого эксперимента, используют для обнуления шкалы поглощения при

508 нм и измеряют поглощение винного раствора при той же длине волны.

2.3.4 Калибровка

По 0,5, 1, 1,5 и 2 мл раствора железа концентрацией 100 мг/л помещают в каждую из четырехмерных колб объемом 50 мл и добавляют в каждую по 20 мл дистиллированной воды. Выполняют процедуру, описанную в п. 2.3.3, для измерения оптической плотности каждого из этих стандартных растворов, содержащих 50, 100, 150 и 200 мкг железа соответственно.

2.4 *Выражение результатов*

2.4.1 Метод расчета

Для расчета выстраивают график зависимости оптической плотности от концентрации железа в стандартных растворах. Записывают поглощение тестового раствора и определяют концентрацию железа в солянокислом растворе для разложения, т. е. в 5 мл анализируемого вина.

Концентрация железа в миллиграммах на литр вина с точностью до одного десятичного знака определяется по формуле:

$$200 \times C$$

Если вино (или сусло) подверглось разбавлению, концентрация железа в миллиграммах на литр вина с точностью до одного десятичного знака определяется по формуле:

$$200 \times F \times C$$

где F – коэффициент разбавления.

Метод OIV-MA-AS322-06 Метод IV-го типа

Медь

(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Сущность метода

Настоящий метод основан на использовании атомно-абсорбционной спектрофотометрии.

2. Аппаратура

2.1 Платиновое блюдо.
2.2 Атомно-абсорбционный спектрофотометр.
2.3 Медная лампа с полым катодом.
2.4 Подача газа: воздух-ацетилен или закись азота/ацетилен.

3. Реактивы

3.1 Металлическая медь.
3.2 Азотная кислота (ρ20 = 1,38 г/мл), 65%.
3.3 Азотная кислота (3.2), разбавленная 1/2 (об./об.) водой.
3.4 Раствор, содержащий 1 г меди / литр.

Предпочтительно использование стандартного промышленного медного раствора. Альтернативный раствор можно приготовить, взвесив 1,000 г металлической меди и перенеся ее без потерь в мерную колбу на 1000 мл. Затем добавляют разбавленную азотную кислоту в количестве, достаточном для растворения металла, добавляют 10 мл концентрированной азотной кислоты и доводят бидистиллированной водой до метки.

3.5 Раствор, содержащий медь в концентрации 100 мг/л

10 мл раствора с концентрацией 1 г/л (п. 3.4.) переносят в мерную колбу объемом 100 мл и доводят до метки бидистиллированной водой.

3.6 Бидистиллированная вода

4. Проведение исследования

4.1 *Подготовка пробы и определение меди*

20 мл пробы переносят в мерную колбу объемом 100 мл и доводят до 100 мл бидистиллированной водой. При необходимости меняют уровень разбавления, чтобы получить отклик в пределах динамического диапазона детектора.

Оптическую плотность измеряют при 324,8 нм. Нулевой уровень устанавливают с помощью дважды дистиллированной воды.

4.2 *Построение стандартной кривой*

Пипеткой вносят по 0,5, 1 и 2 мл раствора меди в каждую из трех мерных колб объемом 100 мл и доводят до объема бидистиллированной водой; растворы содержат 0,5, 1 и 2 мг меди на литр соответственно. Абсорбцию стандартных растворов и приготовленного образца измеряют и повторяют каждое измерение. Выстраивают график, показывающий изменение оптической плотности в зависимости от концентрации меди в стандартных растворах.

5 Выражение результатов

5.1 *Метод расчета*

Уровень концентрации C в мг/л определяют по калибровочной кривой с учетом измеренной оптической плотности проб.
Если F - коэффициент разбавления, уровень концентрации меди определяется в миллиграммах на литр по формуле:

F x C.

Уровень указывают с точностью до двух знаков после запятой.

Примечания:

a) Уровень разбавления пробы должен соответствовать чувствительности используемого прибора и уровню концентрации меди в пробе.

b) При предполагаемом низком уровне концентрации меди действуют следующим образом: 100 мл пробы помещают в платиновую чашку и выпаривают на водяной бане при 100 °C до сиропообразного состояния. Добавляют по каплям 2,5 мл концентрированной азотной кислоты, полностью покрывая дно чашки. Остаток осторожно золят на электроплитке или на слабом огне; затем помещают чашку в муфельную печь с температурой 500 ± 25°C и оставляют примерно на 1 час. После охлаждения золу смачивают 1 мл концентрированной азотной кислоты, измельчая стеклянной палочкой; дают смеси испариться и повторно золят. Блюдо повторно помещают в муфельную печь на 15 мин; повторяют обработку азотной кислотой не менее трех раз. Золу растворяют, добавляя в чашку 1 мл концентрированной азотной

кислоты и 2 мл бидистиллированной воды, и переносят в колбу объемом 10 мл. Блюдо промывают три раза, каждый раз используя 2 мл бидистиллированной воды. Наконец, доводят до объема бидистиллированной водой. Приступают к анализу пробы, как в п. 4.1, но используют 10 мл раствора. При расчете результатов учитывают изменение коэффициента разбавления.

Метод OIV-MA-AS322-07 Метод II-го типа

Магний

1. Сущность метода

Настоящий метод служит для определения уровня содержания магния непосредственно в разбавленных винах методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии.

2. Аппаратура

2.1 Атомно-абсорбционный спектрофотометр с воздушно-ацетиленовой горелкой.

2.2 Магниевая лампа с полым катодом.

3. Реактивы

3.1 Концентрированный стандартный раствор магния, 1 г/л

Предпочтительно использование стандартного коммерческого раствора магния (1 г/л).

Альтернативный раствор можно приготовить, растворив 8,3646 г хлорида магния, MgC12.6H2O, в дистиллированной воде и доведя до объема 1 литр.

3.2 Разбавленный стандартный раствор магния, 5 мг/л.

Примечание: Стандартные растворы магния следует хранить в пластиковых бутылях.

4. Проведение исследования

4.1 *Подготовка образца*

Вино разбавляют дистиллированной водой в отношении 1/100.

4.2 *Калибровка*

5, 10, 15 и 20 мл разбавленного стандартного раствора магния помещают в каждый из четырех наборов мерных колб по 100 мл. и доводят дистиллированной водой до 100 мл. Приготовленные таким образом стандартные растворы содержат 0,25, 0,50, 0,75 и 1,0 мг магния на литр соответственно. Эти растворы следует хранить в пластиковых бутылях.

4.3 *Определение*

Длину волны поглощения устанавливают на 285 нм. Шкалу поглощения обнуляют, используя дистиллированную воду. В спектрофотометр аспирируют разбавленное вино, а затем последовательно стандартные растворы (4.2).

Уровень абсорбции каждого раствора записывают и повторяют каждое измерение.

5. Выражение результатов

5.1 *Метод расчета*

Для расчета выстраивают график, показывающий изменение оптической плотности в зависимости от концентрации магния в стандартных растворах.

Среднее значение оптической плотности разбавленного образца вина записывают на графике и определяют уровень концентрацию магния в миллиграммах на литр. Уровень концентрации магния в миллиграммах на литр вина с точностью до целого числа определяется по формуле:

100 x C

5.2 *Повторяемость (r):* $r = 3$ мг/л.

5.3 *Воспроизводимость (R):* $R = 8$ мг/л.

Метод OIV-MA-AS322-08 Метод IV-го типа

Цинк

1. Сущность метода

Настоящий метод служит для определения уровня содержания цинка непосредственно в винах методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии после удаления спирта.

2. Аппаратура

2.1 Роторный испаритель и термостатическая водяная баня.

2.2 Атомно-абсорбционный спектрофотометр с воздушно-ацетиленовой горелкой.

2.3 Цинковая лампа с полым катодом.

3. Реактивы

Используемая вода должна быть дважды перегнана в аппарате из боросиликатного стекла или иметь эквивалентную степень чистоты.

3.1 Стандартный раствор, содержащий цинк, 1 г/л

Предпочтительно использование коммерческого стандартного раствора цинка. Альтернативный раствор можно приготовить, растворив 4,3975 г сульфата цинка, $ZnSO_4.7H_2O$, в воде и доведя объем до одного литра.

3.2 Стандартный раствор, содержащий 100 мг цинка на литр, разбавляют.

4. Проведение исследования

4.1 *Подготовка образца*

Спирт удаляют из 100 мл вина, уменьшив объем образца до половины его первоначального значения с помощью роторного испарителя (от 50 до 60 °C). Доводят до исходного объема 100 мл дважды дистиллированной водой.

4.2 *Калибровка*

В каждую из четырех мерных колб объемом 100 мл помещают по 0,5, 1, 1,5 и 2 мл раствора, содержащего 100 мг цинка на литр, и доводят бидистиллированной водой до метки. Приготовленные таким образом растворы содержат 0,5, 1, 1,5 и 2 мг цинка на литр.

4.3 *Определение*

Длину волны поглощения устанавливают на 213,9 нм. Шкалу абсорбции обнуляют, используя дважды дистиллированную воду. В горелку спектрофотометра аспирируют вино, а затем последовательно четыре стандартных раствора. Уровень абсорбции записывают и повторяют каждое измерение.

5. Выражение результатов

5.1 *Метод расчета*

Для расчета выстраивают график зависимости оптической плотности от концентрации цинка в стандартных растворах. Среднее значение абсорбции, полученное с разбавленным образцом вина, записывают на кривую и определяют концентрацию цинка в нем с точностью до одного десятичного знака.

Метод OIV-MA-AS322-09 Метод IV-го типа

Серебро

1. Сущность метода

Настоящий метод основан на использовании атомно-абсорбционной спектрофотометрии после озоления образца.

2. Аппаратура

2.1 Платиновое блюдо.
2.2 Водяная баня, регулируемая термостатом до 100 °C
2.3 Печь с выставленной температурой от 500 до 525°C.
2.4 Атомно-абсорбционный спектрофотометр.
2.5 Серебряная лампа с полым катодом.
2.6 Газоснабжение: воздух, ацетилен.

3. Реактивы

3.1 Нитрат серебра, AgN03.
3.2 Азотная кислота (p20 = 1,38 г/мл), 65%.
3.3 Азотная кислота, разбавленная дистиллированной водой в отношении 1/10 (по объему).
3.4 Раствор, содержащий 1 г серебра на литр.

Предпочтительно использование стандартного коммерческого раствора серебра. Альтернативный раствор можно приготовить, растворив 1,575 г нитрата серебра в разбавленной азотной кислоте и доведя до объема 1000 мл разбавленной азотной кислотой (3.3).

3.5 Раствор, содержащий 10 мг серебра на литр.

10 мл раствора с концентрацией 1 мг/л доводят до 1 л разбавленной азотной кислотой.

4. Проведение исследования

4.1 *Подготовка образца*

20 мл образца помещают в платиновую чашку и выпаривают досуха на кипящей водяной бане. Золят в печи при температуре от 500 до 525 °C. Белую золу смачивают 1 мл концентрированной азотной кислоты (3.2). Выпаривают на кипящей водяной бане, повторно добавляют 1 мл азотной кислоты (3.2) и выпаривают второй раз. Добавляют 5 мл разбавленной азотной кислоты (3.3) и осторожно нагревают до растворения.

4.2 Калибровка

2, 4, 6, 8, 10 и 20 мл раствора соответственно (3.5) вносят пипеткой в мерные колбы объемом 100 мл и доводят до метки разбавленной азотной кислотой (3.3): растворы содержат соответственно 0,20, 0,40, 0,60, 0,80, 1,0 и 2,0 мг серебра на литр.

4.3 Длину волны поглощения устанавливают на 328,1 нм. Шкалу обнуляют, используя дважды дистиллированную воду. Измеряют оптическую плотность непосредственно следующих друг за другом стандартных растворов (4.2) и повторяют два раза.

5. Выражение результатов

Для расчета выстраивают график, показывающий изменение оптической плотности в зависимости от концентрации серебра в стандартных растворах.

Уровень концентрации C в мг/л определяют по калибровочной кривой с учетом измеренного уровня поглощения образца.

Уровень концентрации серебра в вине указывают в миллиграммах на литр с точностью до двух знаков после запятой.

$$0{,}25 \times C.$$

Примечание: Уровень концентрации растворов для построения калибровочной кривой, объем взятой пробы и конечный объем жидкости должны соответствовать чувствительности используемого прибора.

Метод OIV-MA-AS322-10 Метод IV-го типа

Кадмий

1. Сущность метода

Настоящий метод для определения уровня содержания кадмия непосредственно в винах методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии при помощи графитовой печи.

2. Аппаратура

Вся стеклянная тара перед использованием должна быть промыта концентрированной азотной кислотой, нагрета до 70-80°C и промыта дважды дистиллированной водой.

2.1 Атомно-абсорбционный спектрофотометр с графитовой печью, коррекцией фона и самописцем.
2.2 Кадмиевая лампа с полым катодом
2.3 Микропипетки на 5 мкл со специальными наконечниками для измерения атомной абсорбции.

3. Реактивы

Используемая вода должна быть дважды дистиллированной, подготовленнной с использованием аппарата из боросиликатного стекла, или вода аналогичной чистоты. Аналитическая чистота всех реактивов должна соответстовать общепризнанным стандартам. Не допускается содержание кадмия в реактивах.

3.1 Фосфорная кислота (ρ20 = 1,71 г/мл), 85%.
3.2 Раствор фосфорной кислоты получают разбавлением 8 мл фосфорной кислоты водой до 100 мл.
3.3 0,02 М раствор динатрия этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).
3.4 Буферный раствор с уровнем pH 9: 5,4 г хлорида аммония растворяют в нескольких миллилитрах воды в мерной колбе объемом 100 мл, добавляют 35 мл 25% (об./об.) раствора гидроксида аммония. Раствор гидроксида аммония, ρ20 = 0,92 г/мл, разбавленный до

25% (об./об.) и доведенный водой до 100 мл.

3.5 Эриохром черный Т, 1% (м/м) раствор в хлориде натрия.

3.6 Сульфат кадмия, 3CdSO4.8H20.

Процентное содержание концентрации сульфата кадмия необходимо проверить следующим способом:

Точно 102,6 мг образца сульфата кадмия смешивают в химическом стакане с небольшим количеством воды и встряхивают до полного растворения; добавляют 5 мл буферного раствора с pH 9 и примерно 20 мг эриохрома черного Т. Титруют раствором ЭДТА (3.3) до тех пор, пока индикатор не начнет становиться синим.

Объем добавленной ЭДТА должен быть равен 20 мл. Если объем немного отличается, взвешенную пробу сульфата кадмия, используемую при приготовлении эталонного раствора, корректируют соответствующим образом.

3.7 Эталонный раствор кадмия из расчета 1 г на литр.

Предпочтительно использование стандартного коммерческого раствора. Альтернативный раствор можно приготовить, растворив 2,2820 г сульфата кадмия в воде и доведя его до одного литра. Раствор хранят в бутылях из боросиликатного стекла с притертой стеклянной пробкой.

4. Проведение исследования

4.1 *Подготовка образца*

Вино разбавляют на 1/2 (об./об.) раствором фосфорной кислоты (3.2).

4.2 *Подготовка калибровочных стандартов*

Готовят последовательные разведения 2,5, 5, 10 и 15 пг кадмия на литр соответственно, используя эталонный раствор кадмия.

4.3 *Определение*

4.3.1 Настройка печи (для ознакомления):

Высушивают при 100°C в течение 30 секунд.

Минерализируют при 900 °C в течение 20 секунд.

Распыляют при температуре 2250 °C в течение 2–3 секунд.

Поток азота (промывочный газ): 6 литров в минуту

Примечание: В конце процедуры увеличивают температуру до 2700 °C для очистки печи.

4.3.2 Атомно-абсорбционные измерения

Длину волны поглощения устанавливают на 228,8 нм. Шкалу абсорбции обнуляют с помощью дважды дистиллированной воды. С помощью микропипетки вводят в печь по три порции по 5 мкл каждого из растворов в пределах диапазона калибровки и анализируемого раствора пробы. Измеренный уровень поглощения записывают. Среднее значение поглощения рассчитывают на основе результатов для трех частей.

5. Выражение результатов

5.1 *Метод расчета*

Для расчета выстраивают кривую изменения поглощения в зависимости от концентрации кадмия в растворах в диапазоне калибровки. Кривая линейна. Среднее значение абсорбции раствора образца выводят на калибровочной кривой и определяют концентрацию кадмия C. Концентрация кадмия, выраженная в микрограммах на литр вина, равна 2C.

БИБИОГРАФИЯ

- MEDINA B., *Application de la spectrométrie d'absorption atomique sans flamme au dosage de quelques métaux dans les vins,* Thèse Doct. en œnologie, Bordeaux II, 1978.
- MEDINA B. and SUDRAUD P., FV O.I.V 1979, n° 695.

Метод OIV-MA-AS322-11

Свинец
(Резолюция Oeno 3/94)

Сущность метода
Свинец определяют непосредственно в вине методом беспламенной атомно-абсорбционной спектрофотометрии.

Материал исключен

Метод OIV-MA-AS322-12 Метод II-го типа

Критерии методов количественного определения уровня свинца в винах
(Резолюция Oeno 7/2006)

1.1 Определения критериев метода

Достоверность = близость соответствия между средним значением, полученным в результате большой серии испытаний, и принятым эталонным значением.

r = предел повторяемости. Значение, ниже которого абсолютная разность между результатами единичных тестов, полученных в условиях воспроизводимости (то есть, та же проба, тот же лаборант, та же аппаратура, та же лаборатория и короткий временной интервал) может ожидаться в рамках особой вероятности (типично 95 %) и, следовательно, r = 2,8 x sr.

S_r = стандартное отклонение, рассчитанное по результатам, полученным в условиях повторяемости.

RSD_r = относительное стандартное отклонение, рассчитанное по результатам, полученным в условиях повторяемости [(Sr/X) x 100], где X — среднее значение результатов по всем лабораториям и пробам.

R = предел воспроизводимости. Значение, ниже которого абсолютная разность между результатами единичных тестов, полученных в условиях воспроизводимости (то есть, на идентичном материале, полученном лаборантами в различных лабораториях, при использовании стандартизированного метода испытаний), может ожидаться в рамках некоторой вероятности (типично 95 %); R = 2,8 x sR.

S_R = Стандартное отклонение, рассчитанное по результатам в условиях воспроизводимости

RSD$_R$= Относительное стандартное отклонение, рассчитанное по результатам, полученным в условиях воспроизводимости [(sR / x-) x 100]

Ho$_R$ = Значение HORRAT: наблюдаемое относительное стандартное отклонение (RSDR) разделенное на показатель RSDR, вычисляемый по уравнению Горвица [1].

2 Метод лабораторного анализа и требования лабораторного контроля

2.1 Требования лабораторного контроля

Для определения уровня содержания свинца в винах используют различные методы. Лабораториям следует использовать метод (II-го типа), утвержденный в рамках требований МОВВ [2], который соответствует критериям эффективности, указанным в таблице 1. Например, методы GFAA или ICP-MS применимы при условии, что они соответствуют критериям эффективности, изложенным ниже. По возможности валидация должна включать сертифицированный эталонный материал в материалы совместных испытаний. В противном случае следует использовать альтернативную оценку точности. Примеры методов определения содержания свинца в вине, валидированных надлежащим образом, приведены в Приложениях 1 и 2.

2.2 Общие соображения

Вся аппаратура, контактирующая с образцом, должна быть изготовлена из инертного материала (например, полипропилена, политетрафторэтилена [ПТФЭ] и т. д.). Не рекомендуется использование керамических материалов в силу содержания свинца. Если нет уверенности в том, что имеющиеся материалы не содержат рассматриваемых аналитов, их использование должно оцениваться путем специальных исследований, которые следует включить в процесс валидации метода анализа. Вся тара из пластика, включая контейнеры для проб, должна быть очищена кислотой. По

возможности оборудование, используемое для подготовки проб, должно применяться исключительно для анализа свинца.

Таблица 1: Критерии эффективности методов анализа уровня содержания свинца в винах

Параметр	**Значение/комментарий**
Применимость	Подходит для определения уровня содержания свинца в вине для служебных целей.
Предел обнаружения	Не более одной десятой значения предела МОВВ (выраженного в пг/л)
Предел количественного определения	Не более одной пятой значения предела МОВВ (выраженного в пг/л), за исключением случаев, когда значение предела для свинца составляет менее 100 пг/л. Для последних не более двух пятых уточненного значения
Точность	Значения HORRAT меньше или равны 2 в валидационном совместном испытании
Восстановление	80–105 % (как указано в совместном испытании)
Специфика	Отсутствие матричных или спектральных помех
Достоверность	$\left\|\bar{x} - m\right\| < 1{,}96 * \sqrt{s_{R(lab)^2} - s_{r(lab)^2} * \left(1 - 1/n\right)}$ где m — аттестованное значение эталонного материала вина, а x — среднее значение n измерений уровня содержания свинца в вине в одной и той же лаборатории. S_R *(lab)* и S_r (*lab*) — стандартные отклонения, рассчитанные по результатам, полученным в одной и той же лаборатории в условиях воспроизводимости и повторяемости.

2.3 Оценка аналитической правильности и расчеты восстановления

По возможности достоверность испытаний должна оцениваться [3] путем включения в аналитический цикл соответствующих

сертифицированных эталонных материалов. Следует принять во внимание публикацию «Гармонизированное руководство по использованию информации по извлечению в аналитических измерениях» [4], разработанную под эгидой IUPAC/ISO/AOAC. Восстановление должно составлять приблизительно 100 %, и в этом случае расчеты восстановления не имеют большого значения.

БИБЛИОГРАФИЯ

[1] W Horwitz, “Evaluation of Analytical Methods for Regulation of Foods and Drugs”, Anal. Chem., 1982, **54**, 67A - 76A

[2] Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, FV 1061, OIV, 1998

[3] ISO 5725-6:1994, 4.2.3. International Organisation for Standardisation, case Postal 56, CH-1211, Genève 20, Switzerland.

[4] ISO/AOAC/IUPAC Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement. *Edited* Michael Thompson, Steven L R
Ellison, Ales Fajgelj, Paul Willetts and Roger Wood, Pure Appl. Chem., 1999, 71, 337 - 348

ПРИМЕР 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ СВИНЦА В ВИНАХ МЕТОДОМ АТОМНО-АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий метод может применяться для красных, белых, тихих, игристых и крепленых вин.

2 ТЕРМИНОЛОГИЯ

Уровень содержания свинца в вине: уровень содержания свинца, определенный с применением настоящего метода, выраженный в мг/л.

3 СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Вино разбавляют синтетической матрицей, имитирующей состав вина. Концентрацию свинца измеряют непосредственно с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии с использованием графитовой печи (GFAAS). Синтетическая матрица, имитирующая состав вина, добавляется как в анализируемое вино, так и в стандартные растворы свинца. Эта смесь содержит как «модификаторы матрицы» GFAAS, так и компоненты, имитирующие вино. Их задачей является «модифицировать» матрицы таким образом, чтобы одна и та же форма поглощения в зависимости от времени была получена как для стандартных растворов, так и для растворов образцов на стадии распыления в графитовой печи.

Необходимо использование механизма замедленного распыления, например, платформы Львова.

Возможна необходимость корректировки точного состава разбавителя для его соответствия параметрам конкретных моделей инструментов графитовой печи. Перед применением метода должны быть проведены эксперименты для проверки зависимости поглощения от времени, полученной с помощью стандартов и образцов, и должны быть внесены

необходимые коррективы в разбавитель. Используемый прибор должен обеспечивать мониторинг зависимости поглощения от времени в процессе распыления. Профиль должен быть таким, чтобы стандарты и образцы работали одинаково, и чтобы пик распыления свинца предшествовал основному фоновому неспецифическому поглощению для эффективной работы механизма коррекции фона. Примеры откорректированных профилей приведены в Приложении 2.

4 РЕАКТИВЫ

Качество химических веществ должно соответствовать самым высоким стандартам с точки зрения отсутствия свинца. Обязательно использование деионизированной дистиллированной воды или воды эквивалентной чистоты. Если не указано иное, все растворы ежедневно готовят заново.

4.1 Разбавляющий раствор

ПРИМЕЧАНИЕ 1: Возможна необходимость корректировки точного состава используемого разбавителя в соответствии с конкретной моделью используемого прибора и графитовой печи. Если возникают проблемы с предложенным составом модификатора, проводят регулировку концентрации фосфатов и нитратов, чтобы получить:

i) стабильный сигнал элемента при оптимальной температуре озоления и

ii) атомизацию с одним воспроизводимым пиком аналита, который отделен во времени от фонового сигнала.

Оборудование с устройствами VDU позволяет подтвердить временное разделение пиков образца и фона (см. Приложение). Ниже приведен пример метода определения зависимости поглощения от времени:

Полную ширину пика измеряют на половине максимальной высоты (FWHM) пика образца и сравнивают с шириной на полувысоте калибровочного стандарта с таким же максимальным поглощением. Если формы пиков явно отличаются, следует скорректировать состав матричного модификатора.

Ниже приведены примеры разбавителей, используемых для:

(a) *Perkin-Elmer 3030, оснащенного дейтериевым корректором фона дуги с печью HGA 500; и (b) Thermo-Electron Video 12E, оснащенного корректором фона Смита-Хифтье, печью CTF 188 и системой осаждения проб aFASTAC.*

4.1.1 *Разбавитель Perkin-Elmer 3030:*

К 187 г воды в пластиковой бутыли объемом 250 мл (5.1) добавляют 11 г этанола (4.1.3.), 1,1 г глюкозы (4.1.4.), 1,1 г фруктозы (4.1.5.) и 0,28 г хлорида натрия (4.1.6.). Встряхивают, чтобы растворить твердые вещества. Затем добавляют 22 мл азотной кислоты (4.1.7.) и 4,4 г дигидроортофосфата аммония (4.1.8.). Встряхивают до полного растворения фосфата. Наконец, добавляют 0,88 г нитрата магния (4.1.9) и снова встряхивают до полного растворения твердого вещества.

4.1.2 *Разбавитель Thermo-Electron Video 12E:*

В данном случае используют только 0,66 г дигидроортофосфата аммония (4.1.8.) и 0,44 г нитрата магния (4.1.9.). Все остальные параметры идентичны параметрам, указанным выше.

4.1.3 *Этанол (абсолютный)*
4.1.4. *D-глюкоза*
4.1.5. *D(-)фруктоза*
4.1.6. *Хлорид натрия*
4.1.7. *Азотная кислота (концентрированная)*
4.1.8. *Дигидроортофосфат аммония*
4.1.9. *Гексагидрат нитрата магния*

4.2 10% этанол (об./об.)

К 180 мл воды в пластиковой бутыли объемом 250 мл (5.1.) добавляют с помощью пипетки 20 мл этанола (4.1.3.) и встряхивают для перемешивания.

4.3. Стандартные растворы свинца

4.3.1. *Стандартный раствор свинца (1000 мг/л)*

4.3.2 *Стандартный раствор свинца (10,00 мг/л)*

В мерную колбу объемом 100 мл (5.2.) пипеткой (5.7.) добавляют 1,00 мл стандартного раствора свинца (4.3.1.). Разбавляют до нужного объема водой и тщательно перемешивают.

ПРИМЕЧАНИЕ 2: Калибровку пипетки проверяют непосредственно перед использованием.

4.3.3 *Рабочий стандарт свинца (1,00 мг/л)*

В мерную колбу объемом 100 мл (5.2.) отвешивают 10,00 г маточного раствора свинца (4.3.2.) с помощью пипетки Пастера (5.3.). Внутреннее горлышко мерной колбы промывают водой, добавляют 1 мл азотной кислоты (4.1.7.) и доводят водой до метки. Встряхивают для тщательного перемешивания.

4.3.4. *Свинцовые калибровочные растворы*

Восемь калибровочных стандартов упакованы в универсальные контейнеры (5.4.). Стандарты охватывают диапазон от 0 до 50 пг/л: 0,0, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 и 50,0 пг/л. Девятый контейнер используется для приготовления заготовки реактива.

Внутреннюю часть каждого контейнера трижды промывают водой и высушивают, встряхивая; крышки промывают три раза и высушивают, встряхивая. Закрытые контейнеры оставляют в вертикальном положении на 5-10 минут, а затем стряхивают оставшуюся жидкость. Вносят пипеткой (5.8) в 9 контейнеров по порядку: 5,00, 5,00, 4,95, 4,90, 4,80, 4,60, 4,40, 4,20 и 4,00 мл воды. В каждый из контейнеров пипеткой вносят (5.8.) 5,00 мл 10 % этанола (4.2), а затем две аликвоты по 5,00 мл разбавителя (4.1).

В 9 контейнеров пипетируют (5.6) (5.7) в следующем порядке: 0 (холостой реагент), 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 мкл рабочего стандарта (4.3.3). Закрывают контейнеры и встряхивают для перемешивания содержимого. Для каждой партии готовят новые образцы.

4.4 1 % (об./об.) азотной кислоты.

5. АППАРАТУРА

Вся используемая стеклянная и пластиковая посуда должна быть очищена кислотой (замочена в 20 % азотной кислоте не менее чем на 24 часа), тщательно промыта дистиллированной водой перед использованием и накрыта (при необходимости пищевой пленкой) для предотвращения загрязнения с воздуха.

5.1 250 пластиковых бутылей с колпачками (например: Nalgene или аналогичные).

5.2 Мерные колбы, 100 мл (класс A).

5.3 пипетки Пастера с сосками

5.4 Универсальные контейнеры, 30 мл (Nunc, Sterilin или аналогичные).

5.5 Стеклянные стаканы, 600 мл.

5.6 Пипетка*, 40–200 пл (Labsystems Finnpipette или аналогичная).

5.7 Пипетка*, 200 - 1000 pl (Labsystems Finnpipette или аналогичная).

5.8 Пипетка*, 0,5–5,0 мл (Labsystems Finnpipette или аналогичная).

5.9 Пипетка*, 2,0–10,0 мл (Labsystems Finnpipette или аналогичная).

**ПРИМЕЧАНИЕ 3: калибровку пипеток следует проводить каждый день (по мере использования).*

5.10 Аналитические весы, (+ или - 1 мг, Mettler PC440 или аналогичные).

5.11 Смеситель вихревого типа или аналогичный

5.12 Пробирки, емкость 20 мл.

5.13 Штативы для пробирок для использования с 5.12.

5.14 Контейнерные стеллажи для использования с 5.4.

5.15 Магнитная мешалка

5.16 Магнитный стержень с тефлоновым покрытием

5.17 Наконечники для пипеток для использования с 5.6, 5.7, 5.8 и 5.9

5.18 Атомно-абсорбционный спектрометр,

Атомно-абсорбционный спектрофотометр, оснащенный графитовой печью, кюветой с задержкой распыления, автоматическим инжектором,

корректором неспецифического поглощения и оборудованием для контроля зависимости абсорбции от времени, эквивалентным следующему. Инструментальные условия должны быть соответствующим образом скорректированы для используемой модели.

Примеры приведены ниже:

(a) Атомно-абсорбционный спектрофотометр Perkin-Elmer 3030, оснащенный дейтериевым дуговым корректором фона для неспецифического поглощения. Свинцовая лампа с полым катодом, работающая при токе 12 мА. Необходимо фиксировать линию 283,3 нм; ширина щели 0,7 нм. Графитовая печь, HGA 500, снабженная трубой из пиролитического графита с твердой пиролитической платформой Львова внутри. Следует использовать аргон в качестве продувочного газа. Рабочие условия печи для HGA 500 следующие:

Этап	1	2	3	4	5	6
Температура (°C)	200	1100	1100	1800	2400	20
Скорость изменения температуры (s)	5	20	1	0	1	1
Задержка (s)	60	20	2	3	6	25
Газ	Ar	Ar	Ar	Ar	Ar	Ar
Расход газа (мл/мин)	50	50	0	0	300	300
Прочтение (интеграция 2.5s)				x		

Автоматический пробоотборник/инжектор, AS 40. Объем инъекции 20 мкл, 3 инъекции на каждую задержку.

(b) Атомно-абсорбционный спектрофотометр Thermo-electron Video 12E, используемый с графитовой печью CTF 188 и системой осаждения образцов FASTAC при следующих условиях:

Этап	1	2	3	4	5
Температура (°C)	150	350	650	1000	2400
Скорость изменения температуры (s)	0	30	15	1	
Задержка (s)	2	0	5	4	10
Газ	Ar	Ar	Ar	Ar	Ar
Расход газа (мл/мин)	50	50	0	0	300
Прочтение (интеграция 2,5 с)				x	

Время осаждения образца 5 с, время задержки FASTAC 10 с, с 3 инъекциями на каждую задержку. Необходимо фиксировать линию 283,3 нм.

6. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1. Приготовление вина

Контейнер с вином встряхивают для тщательного перемешивания содержимого перед отбором проб. Игристые вина следует перелить в чистый химический стакан и поместить в ультразвуковую баню до тех пор, пока не перестанет выделяться газ.

6.2 Измерительные растворы

6.2.1 *Образцы вин*

В пробирку объемом 20 мл (5.12) пипеткой (5.8) помещают 2,00 мл воды, 4,00 мл разбавителя (4.1) и 2,00 мл пробы вина. Тщательно перемешивают с помощью вихревого миксера (5.11).

6.2.2 *Оценки восстановления*

Для оценки восстановления пипеткой (5.8) в пробирку объемом 20 мл (5.12) вносят 1,80 мл воды, 4,00 мл разбавителя (4.1), 2,00 мл пробы вина и добавляют с помощью пипетки (5.7) 0,200 мл рабочего эталона свинца (4.3.3). Тщательно перемешивают с помощью вихревого миксера (5.11).

ПРИМЕЧАНИЕ 4: Любая проба, превышающая уровень наивысшего стандарта калибровки, должна быть повторно проанализирована с использованием меньшей аликвоты пробы. К объему пробы дополнительно добавляют 10% этанола (4.2).

6.3. Измерение

Определения проводят сериями. Каждая серия должна содержать не менее четырех повторов холостого реактива и трех повторов образцов с добавлением для оценки восстановления. Калибровочные растворы свинца равномерно распределяют среди неизвестных на лотке автоматического пробоотборника. Образцы и стандарты переносят в контейнеры для образцов автоматического пробоотборника с помощью пипетки Пастера (5.3). Первую заправку контейнера исключают и измеряют вторую заправку (если раствора образца недостаточно, необходимо позаботиться о том, чтобы контейнеры для образцов были идеально чистыми). Пипетку Пастера промывают четыре или пять раз 1% азотной кислотой (4.4.) между каждым переносом стандарта и образца.

6.4. Количественная оценка свинца

Во всех случаях используется среднее значение оптической плотности от 3 введений. Калибровочный график выстраивают на основе средних откликов, полученных от серийных стандартов. Отмечают значения оптической плотности, зарегистрированные прибором для каждого образца. Концентрацию свинца в растворах проб определяют путем сравнения с калибровочным графиком.

ПРИМЕЧАНИЕ 5:Рекомендуется заменять печную трубу и платформу каждые две партии или чаще, если отмечается снижение абсорбции стандартов.

7 ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты для среднего уровня серийного восстановления проходят корректировку.

7.1 Расчеты

Уровень содержания свинца во всех измеренных растворах получают из калибровочного графика. Содержание свинца в образцах вина и образцах вина с добавлением спирта рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{Концентрация свинца (мг/л)} = \frac{(Cm - Cb) \times Vt}{Vm}$$

Где:
Cm - средний уровень концентрации свинца в измеряемом растворе (мг/л).
Cb - средний измеренный уровень концентрации свинца в холостых растворах реагентов (мг/л).
Vt - конечный общий объем измеряемого раствора (мл).
Vm - объем взятой пробы вина (мл).

7.2 Расчет оценок восстановления

$$\text{Восстановление (\%)} = \frac{(Cs-Ca) \times Vs \times 100}{S}$$

Где:
Cs - расчетный средний уровень концентрации свинца в пробе вина с добавлением шампанского (мг/л).
Ca - расчетный средний уровень концентрации свинца в вине без добавок (мг/л).
Vs - объем вина, к которому добавляется добавка (мл).
S - количество добавки (µг).

7.3 Расчет восстановления скорректированных результатов

$$\text{Скорректированная концентрация Pb (мг/л)} = \frac{Cw \times 100}{Ra}$$

где:
Cw - расчетный уровень концентрации свинца в пробе вина (мг/л).
Ra - среднее извлечение в партии (%).

ПРИЛОЖЕНИЕ: ВАЛИДАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Следующее исследование было проведено процедурами в соответствии с общепринятыми международными стандартами (1)(2).

ТАБЛИЦА 1 ПРИМЕРНАЯ СХЕМА

Номер образца	Описание образца
5 и 9	Бордо (сладкое белое)
3 и 11	Итальянское Шардоне (белое)
7 и 8	Испанское красное обогащенное 260 пг/л
6 и 10	Румынское Пино Нуар
2 и 12	Румынское Пино Нуар, обогащенное 150 пг/л
1	Образец 3/11, обогащенный 124 пг/л
4	Образец 3/11, обогащенный 134 пг/л

ТАБЛИЦА II ОБЗОР СТАТИСТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ СОВМЕСТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ КОНЦЕНТРАЦИИ СВИНЦА В ВИНАХ (Результаты одной лаборатории были исключены из выборки)

Образец	A	B	C	D	E	F	F1
Номер	5,9	3,11	7,8	6,10	2,12	1	4
n	16	15*	16	16	16	16	
n (- выбросы)	16	15	14	16	15	16	
Целевое значение	56	24	279	67	192	143	153
Среднее значение	50,8	27,2	298	70,6	189	143	149
r	23	15	24	32	51	38	
S_r	8,1	5,3	8,7	11,8	18,2	13,6	
RSD_r	16	19	3	17	10	9	
HO_r	**1,0**	**1,1**	**0,2**	**1,1**	**0,7**	**0,7**	
R	42	25	83	57	154	79	
S_R	15,1	8,8	29,8	20,3	55,2	28,2	
RSD_R	**30**	**28**	**10**	**29**	**29**	**19**	
HO_R	**1,2**	**1,2**	**0,5**	**1,2**	**1,4**	**0,9**	

КЛЮЧ К ТАБЛИЦАМ I-II

n Начальное количество лабораторий

n (- выбросы) Количество лабораторий после удаления выбросов

(*) Лаборатория 17 сообщила о значении <20 µг/л для исследуемого образца №11. Результаты были исключены из статистического анализа этого образца (B).

Среднее значение Наблюдаемое среднее значение, полученное в результате совместного исследования после удаления выбросов.

Целевое значение Среднее наблюдаемое значение, полученное «изнутри» с использованием масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой

r Предел повторяемости, показатель, ниже которого абсолютная разность между результатами единичных тестов, полученных в условиях воспроизводимости (то есть, та же проба, тот же лаборант, та же аппаратура, та же лаборатория и короткий временной интервал) может ожидаться в рамках особой вероятности (типично 95 %) и, следовательно, r = 2,8 x sr..

Sr Стандартное отклонение, вычисляемое из результатов, полученных в условиях воспроизводимости.

RSDr Относительное стандартное отклонение, вычисляемое из результатов, полученных в условиях воспроизводимости, [(sr / x) x 100], где x– среднее результатов по всем лабораториям и пробам.
Ho_r Наблюдаемое относительное стандартное отклонение (RSDr), разделенное на показатель RSDr, вычисляемый по уравнению Горвица (Horwitz equation) при использовании предположения, что r = 0,66R

R Предел воспроизводимости, показатель, ниже которого абсолютная разность между результатами единичных тестов, полученных в условиях воспроизводимости (reproducibility) (то есть, на идентичном материале, полученном лаборантами в различных лабораториях, при использовании стандартизированного метода испытаний), может ожидаться в рамках некоторой вероятности (типично 95 %); R = 2,8 x sR.

S_R Стандартное отклонение, вычисляемое из результатов в условиях воспроизводимости.).

RSD_R Относительное стандартное отклонение, вычисляемое из результатов, полученных в условиях воспроизводимости [(sR / x-) x 100]
HoR Наблюдаемое значение RSD_R, деленное на значение RSD_R, рассчитанное по формуле Горвица.

$RSD_R = 2^{(1-0,5\log_{10}C)}$ (где C = концентрация, выраженная в виде десятичной дроби)

Значения HORRAT[(4)]:

Для расчета повторяемости: наблюдаемое относительное стандартное отклонение (RSDr), разделенное на показатель RSDr, вычисляемый по уравнению Горвица при использовании предположения, что r = 0,66R

Для расчета воспроизводимости: наблюдаемое относительное стандартное отклонение (RSDR), разделенное на показатель RSDR, вычисляемый по уравнению Горвица

БИБЛИОГРАФИЯ

1.1 Paul A. Brereton, Paul Robb, Christine M Sargent, Helen M. Crews and Roger Wood. Determination of Lead in Wine by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry: Interlaboratory Study. JAOAC Int., 1997, 80, No 6, 1287-1297.

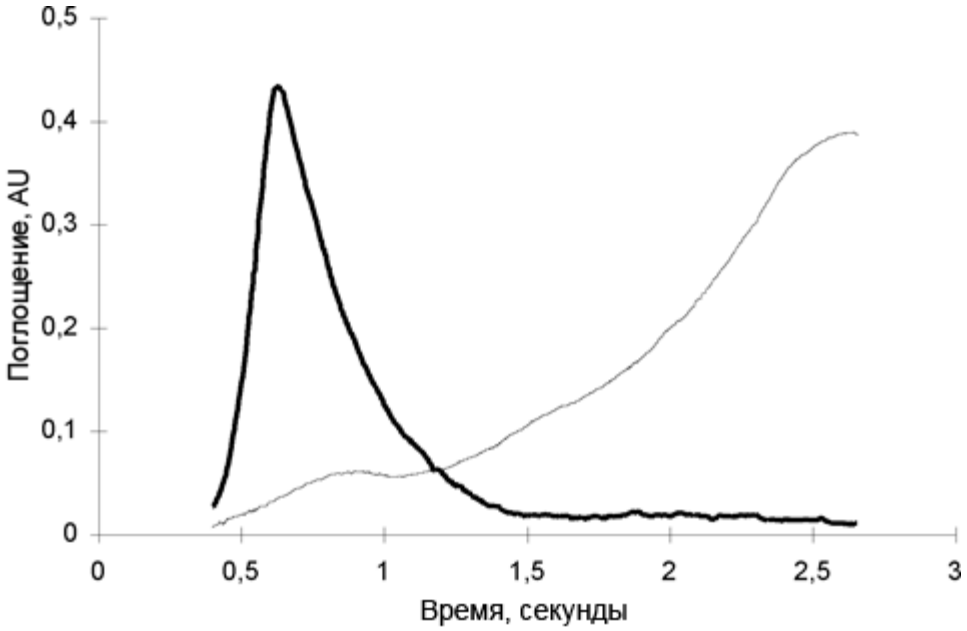
8.2 "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Collaborative Studies." Editor W Horwitz, Pure & Appl. Chem., Vol. 67, No., 2, pp.331-343, 1995

8.3 Horwitz W, Evaluation of Methods Used for Regulation of Foods and Drugs, Analytical Chemistry, 1982, 57, 67A-76A.

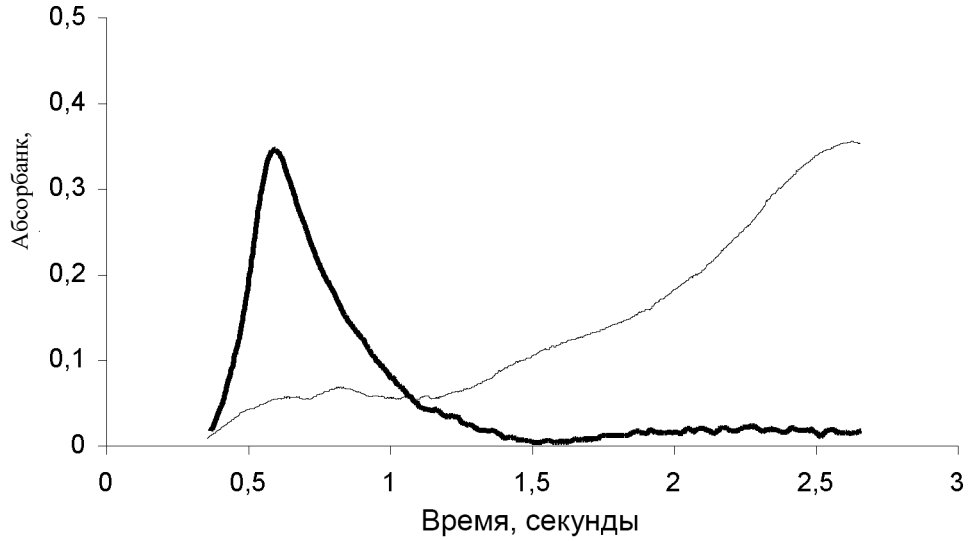
8.4 Peeler J T, Horwitz W and Albert R, Precision Parameters of Standard Methods of Analysis for Dairy Products, JAOAC, 1989, 72, No 5, 784-806.

Приложение

График кривых поглощения в зависимости от времени измерения содержания свинца в вине при помощи атомно-абсорбционного спектрометра Perkin-Elmer 3030 с коррекцией фона дейтериевой дугой.



(i) 30 нг/л эталонное вино



(ii) Образец вина

Ключ: ▬▬ уровень поглощения с коррекцией,
——— неспецифический уровень поглощения

ПРИМЕР 2
ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ СВИНЦА В ВИНЕ МЕТОДОМ АТОМНО-АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ:

Настоящий метод может применяться ко всем типам вин с учетом максимального предела, установленного МОВВ.

2. БИБЛИОГРАФИЯ:

2.1. Journal Officiel des Communautés Européennes (3 octobre 1990). Méthode de dosage du plomb dans le vin (p. 152 et 153).

2.2. Teissèdre P.L., Brun S., Médina B. (1992). Dosage du plomb dans les vins / Proposition de modifications à la méthode du Recueil. Feuillet Vert de l'O.I.V., n°928, 1997/151292.

2.3. Moreira Balio da Silva M., Gaye J., Médina B. (1996). Comparaison de six méthodes de dosage du plomb dans les vins par absorption atomique en four graphite. Feuillet Vert de l'O.I.V. n° 1013, 2310/190196.

2.4. Brereton P., Robb P., Sargent C., Crews H., Wood R. (1996). Validation of a graphite furnace atomic absorption spectrometry method for the detection of lead in wine. Feuillet Vert de l'O.I.V. n° 1016, 2913/230196.

2.5. Bourguignon J.B., Douet Ch., Gaye J., Médina B. (1997). Dosage du plomb dans le vin / Interprétation des résultats de l'essai interlaboratoire. Feuillet Vert 1055 de l'O.I.V. n° 2456/190397.

3. СУЩНОСТЬ МЕТОДА:

Вино не подвергают никаким приготовлениям, кроме разбавления белых сладких вин.

Добавление дигидрофосфата аммония позволяет стабилизировать уровень свинца, содержащегося в вине, при высоких температурах, что приводит к устранению интерференций и действию, идентичному стандартному раствору.
Распылитель представляет собой пиролитический графит, снабженный нагреваемой за счет эффекта Джоуля платформой.
Длина волны используемого луча составляет 283,3 нм.
Коррекция неспецифического поглощения может быть осуществлена с помощью эффекта Зеемана или с помощью дейтериевой газоразрядной лампы.

Способ определения свинца в вине – метод прямого дозирования с внешней калибровкой.

4. РЕАКТИВЫ

4.1. Деминерализованная вода: сверхчистая; с удельным сопротивлением выше 18 МОм/см.

4.2. Азотная кислота: 65%; кислота качества «suprapur».

4.3. дигидрогенофосфат аммония $NH_4H_2PO_4$ для анализа.

4.4. Стандартный раствор свинца: 1000 µг/мл (или 1 г/л) в 2% азотной кислоте (коммерческий раствор, готовый к использованию).

5. АППАРАТУРА

5.1 Аналитические весы (e = 1 мг).

5.2 Стеклянная посуда:

5.2.1 *Мерная колба* 50, 100 мл (класс А),

5.2.2 *Пипетка объемная* 1, 10 мл (класс А),

5.2.3 *Дезактивация стеклянной посуды:* посуду промывают в деминерализованной воде; вымачивают не менее 24 часов в тазу с 10% азотной кислотой; промывают два раза в деминерализованной воде.

5.3 Атомно-абсорбционный спектрофотометр, оснащенный графитовым распылителем для неспецифической коррекции абсорбции и автоматическим

пробоотборником (промывают ведра пробоотборника 10% азотной кислотой).

5.3.1. Графитовая печь с пиролитическим покрытием, содержащая платформу Львова, возможно, танталит (ссылка 9.1 - см. ниже:

5.3.1.1 Танталовый раствор: 3 г порошка тантала (металлический тантал чистотой выше 99,7%) помещают в тефлоновую цилиндрическую колбу объемом 100 мл; добавляют 10 мл разведенной плавиковой кислоты (1+1), 3 г обезвоженной щавелевой кислоты и 0,5 мл 30%-ного раствора перекиси водорода; аккуратно нагревают вместе для растворения металла; добавляют перекись водорода, когда реакция замедляется. Добавляют 4 г обезвоженной щавелевой кислоты и примерно 30 мл деминерализованной воды после полного растворения. Растворяют кислоту. Доливают раствор до 50 мл. Раствор хранят в пластиковой колбе.

5.3.1.2 Нанесение тантала на платформу: платформу размещают внутри графитовой трубки. Конструкцию крепят к распылительному устройству на спектрофотометр. Раствор тантала 10 мкл вводят на платформу с помощью автоматического пробоотборника. Температурный цикл задается по следующей программе: сушка при 150°C в течение 40 с; минерализация при 900°C в течение 60 с; распыление при 2600°C в течение 2,5 с. В качестве инертного газа используют аргон.

6. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1 Отбор пробы: Горлышко винной бутылки с луженой свинцовой капсулой необходимо тщательно очистить перед откупориванием.

6.2 Приготовление образца: Как правило, подготовка вина не требуется; образцы помещаются непосредственно в емкости автоматического пробоотборника. Мутное вино необходимо фильтровать. Для продления срока эксплуатации платформ белые сладкие вина разбавляют при содержании сахара от 10 до 50 г/л на 1/2, при содержании выше 50 г/л на 1/4.

6.3 Приготовление растворов:

6.3.1 *Пустой раствор для разбавления:*
Раствор используется в качестве дополнительного объема и состоит из деминерализованной воды, содержащей 1 % азотной кислоты (4.2.).

6.3.2. *Модификатор матрицы:*
В колбу объемом 50 мл (5.2.1) вводят 3 г дигидрофосфата аммония (4.3); растворяют и заполняют деминерализованной водой (4.1.).

6.3.3. *10 мг/л раствора свинца:*
В колбу объемом 100 мл (5.2.1) помещают 1 мл раствора 1 г/л (4.4.); добавляют 1 % азотную кислоту (4.2.); доводят до нужного объема деминерализованной водой (4.1.). Этот раствор хранят один месяц при температуре +4°C.

6.3.4 *100 мкг л раствора свинца:*
В колбу объемом 100 мл (5.2.1) помещают 1 мл раствора свинца с концентрацией 10 мг/л (6.3.3); доводят до объема деминерализованной водой (4.1.). Раствор необходимо готовить каждый день анализа.

6.3.5 *Калибровочная шкала* (для информационных целей): 0 ; 16,7 ; 33,3 и 50 пг/л (см. Таблицу II).

6.4 Калибровка и определение:

6.4.1 *Спектрометрическое измерение:*

6.4.1.1 длина волны: 283,3 нм;
6.4.1.2 ширина прорези: 0,5 нм;
6.4.1.3 сила тока лампы с полым катодом: 5 мА;
6.4.1.4 постоянная корректировка фона: эффект Зеемана или эффект дейтерия;
6.4.1.5 введение стандартов и проб в прогретом состоянии в графитовую печь с помощью автоматического пробоотборника. Промывочная жидкость состоит из 500 мл деминерализованной воды, содержащей каплю Triton X 100.
Примечание: для впрыска при 90°C на платформе температуру печи следует отрегулировать примерно до 150°C.
6.4.1.6 измерение сигнала: высота пика;
6.4.1.7 продолжительность измерения: 3 секунды;
6.4.1.8 Количество измерений по стандарту или образцу: 2
Примечание: результат испытания составляет среднее значение этих двух определений. Если коэффициент вариации для двух определений превышает 15 %, два других определения необходимо провести повторно.

6.4.1.9. Параметры печи (для информации): см. Таблицу I.

Таблица I - Параметры печи

Для определения уровня содержания свинца в вине

Температура (в ° C)	Продолжительность (с)	Тип газа	Расход газа (л/мин)	Чтение сигнала
150	60	аргон	3.0	
750	10	аргон	3.0	
750	30	аргон	3.0	
750	2	аргон	0	
2400	1	аргон	0	да
2400	2	аргон	0	да
2400	2	аргон	3.0	
40	20	аргон	3.0	

6.4.1.10. Параметры автоматического пробоотборника (для информации): см. Таблицу II.

Таблица II - Параметры пробоотборника для дозировки свинца в вине

Анализ:	объемы закачки в µл			
	образец	раствор свинца 100 µг/л	Пустой раствор для разбавления	Модификатор матрицы
Калибровочная	0	0	5	1
Стандарт 1	0	1	4	1
Стандарт 2	0	2	3	1
Стандарт 3	0	3	2	1
Образец	2	0	3	1

6.4.2 *Отслеживание калибровочной кривой:* автоматический цикл распределения позволяет готовить стандарты из растворов свинца с концентрацией 100 пг/л (таблица II). Калибровочный график выражает впитывающую способность в зависимости от концентрации свинца в микрограммах на литр.

7. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

7.1 Уровень концентрации свинца в закачиваемом растворе: рассчитывается на основе калибровочной кривой (6.4.2.).

7.2 Уровень концентрации свинца в вине: рассчитывается путем умножения на 3 результата, приведенного в 7.1. (2 мкл раствора вводят до конечного объема 6 мкл на платформе). Принимается в расчет возможное разбавление вин (в случае белых сладких вин).

7.3 Результат: выражается в миллиграммах свинца на литр вина (мг/л) с точностью до двух знаков после запятой.

8. МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Было проведено «двойное слепое» исследование 8 различных вин, полученных из смесей вин Бордо: двух красных вин (R1 и R2), двух розовых вин (Ro1 и Ro2), двух белых сухих вин (Bs1 и Bs2) и двух белых сладких вин (D1 и D2). В определении свинца в 16 полученных пробах принимали участие одиннадцать лабораторий из Испании, Португалии, Марокко и Франции.

8.1 Представление 8 образцов вина:

Таблица III: Характеристики вин, использованных в межлабораторных испытаниях

Вино	Тип вина	Крепость спирта по объему (% об.)	Общая кислотность (г/л H2SO4)	Летучая кислотность (г/л H2SO4)	Редуцирующий сахар (г/л)
R1	Красное	11,86	4,43	1,57	1,2
R2	Красное	12,54	3,77	0,34	1,5
Ro1	Розовое	12,23	5,30	0,44	1,2
Ro2	Розовое	11,43	4,88	0,45	1,1
Bs1	Сухое белое	11,65	4,62	0,37	2,2
Bs2	Сухое белое	12,32	4,57	0,31	0,9
D1	Сладкое белое	12,94	3,72	0,67	76,4
D2	Сладкое белое	12,66	4,70	0,45	62,8

8.2 Статистика результатов:

Таблица IV: Статистический анализ результатов межлабораторных испытаний

Образец вина	R1	R2	Ro1	Ro2	Bs1	Bs2	D1	D2
Двойное слепое повторение	C и K	F и I	D и G	J и L	B и H	P и N	A и E	M и 0
Начальное количество лабораторий	11	11	11	11	11	11	11	11
Количество лабораторий После устранения больших отклонений	11	10	11	11	10	10	11	10
Среднее значение (µг/л)	44	162	28	145	52	138	60	145
Предел повторяемости	18	12	7	17	6	13	28	7
Стандартное отклонение повторяемости S_r	6,4	4,3	2,5	6,1	2,1	4,6	10	2,5
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSDr (%)	14,5	2,8	9,2	4,2	4,2	3,4	16,5	1,8
Значение Horrat (Hor): наблюдаемое значение RSDr / RSD_r	0,6	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,7	0,1
Предел воспроизводимости R	34	105	23	86	30	101	86	144
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R	12,3	37,5	8,2	30,8	10,7	35,9	30,6	51,6
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R (%)	28	23,1	29,3	21,2	20,6	26	51	35,6
Значения Horrat (HoR): наблюдаемое RSD_R/ RSD_R Горвиц	1,1	1,1	1,1	1	0,8	1,2	2,1	1,7

Из 11 лабораторий, участвовавших в испытании, 7 лабораторий следовали предложенному методу, а 4 изменили некоторые параметры.

9. ПОКАЗАТЕЛИ МЕТОДА И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

9.1 Предел обнаружения: определяется из серии из 20 пустых аналитических повторений и равен 3 стандартным отклонениям. В случае предлагаемого метода для серии из 20 контрольных аналитических измерений были получены следующие значения: среднее значение = 1,29 пг/л; стандартное отклонение = 0,44 пг/л; предел обнаружения = 1,3 пг/л.

9.2 Предел количественного определения: равен 3-кратному пределу обнаружения. В случае предлагаемого метода предел количественного определения составляет 4 пг/л (3*1,32=3,96).

9.3 Достоверность: доверительный интервал для среднего значения серии результатов сравнивается с данными эталонного материала.

Для исследования использовались три эталонных материала: красное вино, белое сухое вино, белое сладкое вино, уровень концентрации свинца для которых сертифицирован BCR (Bureau Communautaire de Référence) в 1992 году.

Таблица V. Достоверность метода

		Красное вино BCR E	Белое сухое вино BCR C	Белое сладкое вино BCR D
Концентрация свинца (µг/л)	Сертифицированное значение	36,1 ± 4,9	65,1 ± 9,1	132,4 ± 32
	Среднее значение (серия: 10 результатов)	41,0 ± 3,8	66,0 ± 4,4	128,3 ± 14,1

9.4 Контрольная карта

На каждый используемый эталонный материал может быть составлена контрольная карта.

Контрольные пределы равны: +/- 2 SRintra (SR intra: стандартное отклонение воспроизводимости).

10. БИБЛИОГРАФИЯ

10.1. Zatka V. (1978). Treated graphite atomizer tubes for atomic absorption spectrometry. Analytical Chemistry, vol. 50, n°3.
10.2. US Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms (1991). Analysis of lead in wines and related products by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Note d'information de l'O.I.V. du 21 août 1991 : « Plomb dans les vins aux U.S.A. ».
10.3. Mindak W.R. (1994). Determination of lead in table wines by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Journal of A.O.A.C. International, vol. 77, n°4, p. 1023-1030.
10.4. Médina B. (1994). Apport de nouvelles techniques au dosage des métaux dans les vins. Congrès des Œnologues de France à Bordeaux.

10.5. Norme française NF ISO 5725-2 (1994). Application de la statistique : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure.
10.6. Jorhem L., Sundström B. (1995). Direct determination of lead in wine using graphite furnace AAS. Atomic Spectroscopy, September/October 1995.

Метод OIV-MA-AS322-13 Метод III-го типа

Анализ минеральных элементов в винах с помощью ICP-AES (индуктивно-связанная плазма / атомно-эмиссионная спектрометрия)

(Резолюция Oeno 478/2013)

1. Предупреждение

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ - При работе с кислотами работникам необходимо защищать руки и глаза. Работа с кислотами должна проводиться под лабораторным колпаком.

2. Область применения

Данный способ определения концентрации элементов в винах, указанных ниже, основан на методе атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES):

- Основные минеральные элементы:
  - Калий (до 1500 мг/л)
  - Кальций (до 250 мг/л)
  - Магний (до 150 мг/л)
  - Натрий (до 100 мг/л)

- Второстепенные минеральные элементы:
  - Железо (от 1 до 10 мг/л)
  - Медь (от 0,1 до 5 мг/л)
  - Цинк (от 0,5 до 5 мг/л)
  - Марганец (от 0,5 до 5 мг/л)
  - Стронций (от 0,1 до 3 мг/л)
  - Алюминий (от 0,75 до 7,5 мг/л)
  - Барий (от 0,1 до 5 мг/л)

3. Сущность метода

3.1 Одновременный анализ основных и второстепенных элементов

В подготовке образцов для анализа основных и второстепенных элементов в данном методе используется разведение 1:5. Калибровочный диапазон содержит этанол (2,5%) для учета матричных эффектов, связанных с его присутствием во время распыления и при повышении температуры плазмы, а также азотную кислоту (HNO3 - 1%), которая используется для стабилизации растворов.
Линии Sc 335.372 (скандий в концентрации 5 мг/л) и Cs 697.327 (цезий в концентрации 1% в CsNO3), предложенные в данном методе, могут использоваться в качестве внутреннего стандарта для снижения влияния неспектральных помех.
Для оптимизации метода можно использовать и другие правильно отобранные внутренние стандарты, например, Y 371.029.
Цезий в форме CsNO3 тоже может служить ионным буфером в качестве используемого внутреннего стандарта, присутствие данного буфера устанавливает ионизационные балансы других компонентов. Хлорид цезия CsCl может также использоваться в качестве ионного буфера.
Внутренние стандарты и ионный буфер готовятся в одной колбе, они вводятся в образец через третий канал перистальтического насоса до подачи однородной смеси через распылитель.

3.2 Анализ основных элементов

Анализ основных элементов может быть выполнен способом разбавление образца 1:50. Азотная кислота (HNO3 - 1%) добавляется в стандарты и образцы для стабилизации растворов.
Учитывая данное разбавление, влияние матрицы считается незначительным и использования внутренних стандартов не требуется. Аналогично, нет необходимости добавлять этанол в калибровочный диапазон.

4. Реагенты и растворы

Если нет других указаний, все используемые реагенты должны быть установленного лабораторного качества.

4.1 Ультрачистая деминерализованная вода с удельным сопротивлением более 18 MΩ в соответствии со стандартом ISO 3696.

4.2 Сертифицированный раствор(ы) моноэлемента (до 1000 или 10 000 мг/л) для анализируемых минеральных элементов и внутреннего стандарта (например, скандия).

4.3 Внутренний контроль: сертифицированный эталонный материал (вино)или образец из программы межлабораторного сравнения, который включает анализируемые элементы.

4.4 Азотная кислота концентрации более 60% (для следового анализа) (CAS №7697-37-2).

4.5 Этанол в концентрации более 95% (для следового анализа) (CAS No.64-17-5).

4.6 Раствор 1% азотной кислоты

Готовят 1%-ный раствор азотной кислоты, добавив 10 мл азотной кислоты (4.4) в колбу емкостью 1000 мл.

5. Аппараты и оборудование

5.1 Оптико-эмиссионный спектрометр с возбуждением индуцированной аргоновой плазмой и дисперсионной системой (для анализа длин волн см.таблицу в разделе 7) с аксиальной, радиальной или двойной конфигурацией и предпочтительно последовательным детектором типа PM, CCD, CID или SCCD.

Примечание 1: Если в методе применяются внутренние стандарты, настоятельно рекомендуется проводить многоэлементный анализ с использованием спектрометра одновременного типа.

Примечание 2: Можно использовать другие системы для введения образца для повышения чувствительности и надежности метода (система впрыска непрерывного потока, система микроволновой десольватации (MWDS и т.д.).

5.2 Калиброванные микропипетки, позволяющие брать объемы от 200 мкл до 5 мл и/или градуированные пипетки класса А на 1,5 и 10 мл.

5.3 Волюметрические колбы класса А

Примечание 3: *Оборудование, контактирующее с образцом, должно находиться в растворе азотной кислоты (4.4) с концентрацией 10% в*

течение12 часов, затем промываться несколько раз деминерализованной водой (4.1).

Для оценки надежности метода в зависимости от используемого прибора рекомендуется рассчитать отношение интенсивности Mg 279,800/Mg 285,213; где Mg 285,213 - атомная линия, и Mg 279,800 - ионная линия.

6. Подготовка образцов

6.1 Подготовка диапазона калибровки

Количество калибровочных растворов зависит от требуемой надежности. Необходимо не менее пяти калибровочных растворов. Надежность и точность результатов можно проверить путем анализа эталонного материала.

Диапазон выбирают в соответствии с проведенным разбавлением. Он должен охватывать диапазоны различных элементов. Важно, чтобы концентрация азотной кислоты была одинаковой в стандартах и образцах.

6.1.1 Приготовление стандартного раствора для одновременного анализа основных и второстепенных элементов (разведение 1:5):

С помощью микропипетки (5.2) вносят нужный объем стандарта, 2,5 мл этанола (4.5) и 1 мл азотной кислоты (4.4) в колбу объемом 100 мл (5.3). Доводят до 100 мл деминерализованной водой (4.1) и перемешивают.

6.1.2 Приготовление стандартного раствора для анализа основных элементов (разведение 1:50):

Используя микропипетку (5.2), вносят необходимый объем стандарта в 100 мл колбу (5.3), доводят до 100 мл раствором азотной кислоты (4.6) и перемешивают.

6.2 Подготовка образцов для анализа

6.2.1 Подготовка проб для одновременного анализа основных и второстепенных элементов (разбавление 1:5):

Используя градуированную пипетку или микропипетку (5.2), вводят 10 млобразца и 1 мл азотной кислоты (4.4) в колбу на 50 мл (5.3). Доливают до 50 мл деминерализованной водой (4.1) и перемешивают.

Образцы игристого вина должны быть подвергнуты дегазации с использованием, например, ультразвуковой ванны в течение не менее 10 минут.

Для разрушения органических соединений образцов богатых сахаром используется минерализация путем микроволнового сбраживания в азотной кислоте. Иногда может потребоваться большее разбавление по причине слишком высокой концентрации определенных элементов. В данном случае содержание этанола в растворах и стандартах корректируется соответствующим образом.

Примечание 4: В зависимости от надежности используемого прибора, с учетом использования ионного буфера и внутренних стандартов, можно работать с коэффициентом разбавления 1:2 с целью повышения чувствительности метода для определенных микроэлементов. В итоге необходимо изменить диапазоны калибровки, содержание этанола и, возможно, экспериментальные параметры (мощность).

6.2.2 Подготовка проб для анализа основных элементов(разбавление 1:50)

С помощью градуированной пипетки или микропипетки (5.2) вносят 1 мл образца вина и 0,5 мл азотной кислоты (4.4) в колбу объемом 50 мл (5.3). Доливают до 100 мл деминерализованной водой (4.1) и перемешивают.

7. Проведение исследования

Экспериментальные параметры

Ниже описаны оптимальные параметры прибора, которые позволяют нам достичь особых требований данного метода с точки зрения повторяемости и воспроизводимости. Представленные в качестве примера параметры могут быть изменены в зависимости от используемого прибора.

Мощность: 1,3 кВт
Поток плазменного газа: 15 л/мин
Расход вспомогательного газа: 1,5 л/мин

Давление распылителя: 200 кПа
Период стабилизации: 20 с
Время измерения на одну копию: 5 с
Скорость насоса: 15 об/мин
Время ополаскивания:30 с
Внутренний стандартный диаметр входного отверстия:0,51 мм
Внутренний диаметр входного отверстия для пробы: 0,8 мм
Включают устройство (насос работает, плазма включена) и очищают систему в течение не менее 20 минут 1%-ной азотной кислотой (4.6).

Анализируют холостой образец, следуя серии стандартов в порядке возрастания концентрации. Контрольный образец (4.3) можно использовать как внутренний контроль качества при правильной калибровке. Затем снова анализируют холостой образец и убеждаются в отсутствии эффекта памяти. Далее проводят анализы образцов, вставляя контрольный образец через каждые 10 образцов и в конце серии анализов.
На основе результатов, полученных по отношению к контрольному образцу, можно составить контрольную карту для дальнейшего выявления отбраковки данных и связанных с ними действий, которые необходимо предпринять в случае отклонения данных.

Анализы проводятся для каждого элемента с использованием как минимум 3-х повторений.

Линии, которые могут использоваться для различных элементов (в зависимости от оборудования могут использоваться другие).

Элементы	Основная линия *(E_{sum} = E_{exc} + E_{ion})*	Соответствующий внутрений стандарт	Вторичная линия *(E_{sum} = E_{exc}*	Соответствующий внутренний стандарт
K	769.897 (I) *(1.6 eV)*	Cs 697.327	766.491 (I)	Cs 697.327
Ca	317.933 (II) *(10 eV)*	Sc 335.372	315.887 (II) *(10.1 eV)*	Sc 335.372

Mg	285.213 (I) *(4.3 eV)*	Cs 697.327	279.800 (II) *(10.6 eV)*	Sc 335.372
Na	589.592 (I) *(2.1 eV)*	Cs 697.327		
Fe	259.940 (II) *(12.7 eV)*	Sc 335.372	239.563 (II) *(11.4 eV)*	Sc 335.372
Cu	327.395 (I) *(3.8 eV)*	Cs 697.327	324.754 (I) (3.8 eV)	Cs 697.327
Zn	213.857 (I) *(5.8 eV)*	Cs 697.327	206.200 (II) *(12.2 eV)*	Sc 335.372
Mn	257.61 (II) *(12.3 eV)*	Sc 335.372	260.568 (II) *(11 eV)*	Sc 335.372
Sr	421.552 (II) *(8.6 eV)*	Sc 335.372	407.771 (II) *(8.7 eV)*	Sc 335.372
Al	396.152 (I) *(3.1 eV)*	Cs 697.327	167.019 (I) *(7.4 eV)*	Cs 697.327
Rb	780.026 (I) *(1.6 eV)*	Cs 697.327		

Li	670.783 (I) *(1.9 eV)*	Cs 697.327		
Ba	455.403 (II) *(7.9 eV)*	Sc 335.372		
Sc	335.372 (II) *(10.3 eV)*			
Cs	697.327 (I) *(1.8 eV)*			

8. Вычисления

Рассчитывают концентрацию элементов в образце, используя следующую формулу:

$$C = \frac{Cm \times Vt}{Vm}$$

где:

C: концентрация элемента в образце вина (мг/л)
Cm: концентрация элемента в разбавленном растворе (мг/л)
Vt: объем колбы для разбавления (мл) (здесь V=50 мл)
Vm: объем образца, взятого для разбавления (мл) (здесь V=1 или 10 мл)

9. Прецизионность

Элемент	Повторяемость (RSD %)	Воспроизводимость (RSD %)	LD (мг/л)	LQ (мг/л)	Скорость восстановления
K	2.3	5.5	основной	основной	Между 80% и 120%
Ca	3.5	11.3	основной	основной	
Mg	2.4	8.9	основной	основной	
Na	2.6	9.1	основной	основной	
Fe	2.2	6.9	0.08	0.25	
Cu	13.4	15.8	0.03	0.10	
Zn	3.6	6.5	0.03	0.10	
Mn	4.7	7.0	0.03	0.10	
Al	5.6	17.0	0.03	0.10	
Sr	2.1	9.9	0.03	0.10	
Ba	8.2	20.8	0.03	0.10	

ПРИЛОЖЕНИЕ:

ВАЛИДАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ - Результаты совместных испытаний

Валидационное исследование было проведено в ноябре 2011 года(предваритеьное исследование) и в феврале 2012 (валидационное исследование) в соответствии с ISO 5725 и резолюцией OENO 6/2000.

Предварительное исследование:

3 образца (сухое белое вино, красное вино и сладкое белое вино) были проанализированы методом стандартных добавок на наличие Al, Fe, Cu, Sr, Ba, Mn и Zn.

	Образцы		
Элемент (мг/л)	Красное вино	Сухое белое вино	Сладкое вино
K	1258	725	841
Ca	50	75	81
Na	20	28	24
Mg	78	70	66
Аль	1.29	1.33	1.97
Fe	8.12	6.91	9.29
Cu	0.86	0.86	0.94
Sr	1.07	1.08	1.07
Ba	0.77	0.72	0.63
Mn	1.6	2.01	1.77
Zn	1.51	2.53	1.69

ОБРАЗЦЫ

	Белое вино 1			Белое вино 2		
Элемент	Эталон. значение	Добавка(мг/л)	Восстановление	Эталон. значение	Добавка (мг/л)	Восстановление
K	754	0	98	1080	351	96
Ca	83	11	98	76	0	102
Na	50	28	105	24	0	100
Mg	65	0	98	72	7	102
Ал	0.50	0	100	1.19	1	104
Fe	2.86	1	94	1.71	0	97
Cu	0.04	0	не доб.	0.71	1	103
Ст	1.27	1	105	0.22	0	108
Ba	0.08	0	102	0.64	1	96
Mn	1.84	1	98	1.12	0	102
Zn	1.40	0	100	2.12	1	102

	Красное вино 1			Красное вино 2		
Элемент	Эталон. значение	Добавка (мг/л)	Восстановление	Эталон. значение	Добавка (мг/л)	Восстановление
K	1160	70	100	1371	316	95

Ca	62	1	103	67	7	101
Na	71	56	100	19	0	100
Mg	82	7	102	80	0	99
Ал	0.81	0	105	1.82	1	103
Fe	4.90	0	101	4.55	0	101
Cu	0.46	0	102	0.12	0	65
Ст	0.28	0	102	1.32	1	105
Ba	0.12	0	102	0.62	1	97
Mn	1.81	1	100	1.10	0	101
Zn	0.95	0	107	1.68	1	101

	Сладкое вино 1			Сладкое вино 2		
Элемент	Эталон. значение	Добавка (мг/л)	Восстановление	Эталон. значение	Добавка (мг/л)	Восстановление
K	1105	246	96	832	0	102
Ca	85	4	99	92	10	101
Na	68	42	98	21	0	100
Mg	63	0	97	66	6	101
Ал	1.65	1	101	0.80	0	96
Fe	3.03	0	97	4.63	0	101
Cu	0.73	1	101	0.12	0	94
Ст	1.73	1	106	0.22	0	96
Ba	0.11	0	94	0.34	0	90
Mn	1.01	0	99	1.62	1	102
Zn	1.53	1	102	1.18	0	100

Лаборатории-участники имели возможность выбрать метод проведения анализа

- в два этапа: высокое разведение основных элементов и низкое разведение второстепенных элементов, рекомендовано использовать внутренние стандарты.
- в один этап: одинаковое разведение для всех элементов с использованием внутренних стандартов.

Для каждого номера образца и для каждого определения использовалось первое индивидуальное значение. Два отдельно взятых слепых

идентичных повтора для каждой лаборатории рассматривались как единый материал.
Исключение выбросов проводилось на основе последовательного применения тестов Кохрана (для дисперсии) и Граббса (для средних значений) (при уровне вероятности (P) 2,5%, односторонний тест Кохрана и двусторонний тест Граббса) до тех пор, пока не были замечены новые выбросы или пока в лабораториях, предоставлявших достоверные данные, не произошло снижение первоначального числа до 22,2%.

Все элементы соответствовали требованиям, за исключением элемента кальция в образце "сладкое вино 2", для которого значение Horrat R составляет 2,2. Всего 93% лабораторий имели удовлетворительный Z-показатель по этому образцу (14 результатов) и 7% лабораторий имели сомнительный результат Z- показателя (1 результат). Следовательно, поскольку пять других образцов соответствовали требованиям определения кальция, включая другой образец сладкого вина с той же концентрацией кальция, образец сладкого вина с концентрацией кальция решено было утвердить и включить данный элемент в аналитический метод.

Для определения основных элементов 9 лабораторий использовали высокое разведение, 6 лабораторий использовали одно разведение для всех элементов (основных и второстепенных). Различий между результатами обеих групп не наблюдалось.

Таблица 1 – Калий

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего Допущено Повторов	15,00 13,00 2,00	15,00 13,00 2,00	15,00 14,00 2,00	15,00 11,00 2,00	15,00 14,00 2,00	15,00 14,00 2,00
V станд. (мг/л)	754,38	1079,82	1160,33	1370,96	1105,46	831,62
Предел повторяемости - r RSD r (%) RSD r Horwitz r Horrat	22,45 1,10 3,90 0,30	47,32 1,50 3,69 0,40	132,68 4,00 3,65 1,10	50,64 1,30 3,56 0,40	124,78 4,00 3,68 1,10	42,92 1,80 3,84 0,50

Предел воспроизводимости - R	139,25	182,82	165,46	147,56	176,10	142,93
RSD R (%)	6,50	6,00	5,00	3,80	5,60	6,10
RSD R Horwitz	5,90	5,59	5,53	5,39	5,57	5,82
R Horrat	1,10	1,10	0,90	0,70	1,00	1,00

Таблица 2 – Кальций

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Допущено	10,00	10,00	13,00	10,00	13,00	15,00
Повторов	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
V станд. (мг/л)	85,37	73,43	67,68	66,00	78,35	92,39
Предел повторяемости - r	3,30	4,12	4,60	2,86	7,96	26,66
RSD r (%)	2,10	2,00	2,40	1,50	3,60	10,20
RSD r Horwitz	5,85	5,53	5,60	5,62	5,48	5,34
r Horrat	0,30	0,40	0,40	0,30	0,70	1,90
Предел воспроизводимости - R	10,68	10,45	42,58	9,51	29,85	45,60
RSD R (%)	4,40	5,00	22,20	5,10	13,50	17,40
RSD R Horwitz	8,19	8,38	8,48	8,52	8,30	8,10
R Horrat	0,50	0,60	2,60	0,60	0,60	2,20

Таблица 3 – Натрий

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Допущено	15,00	13,00	12,00	12,00	14,00	15,00
Повторов	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
V станд. (мг/л)	50,50	24,09	71,43	18,76	67,91	21,42

Предел повторяемости - r	3,00	1,32	2,53	1,73	5,20	1,85
RSD r (%)	2,10	1,90	1,20	3,30	2,70	3,00
RSD r Horwitz	5,85	6,54	5,55	6,79	5,60	6,6
r Horrat	0,30	0,30	0,20	0,50	0,50	0,50
Предел воспроизводимости - R	9,41	6,09	15,19	6,72	13,09	6,49
RSD R (%)	6,60	9,90	7,50	12,70	6,80	10,70
RSD R Horwitz	8,87	9,91	8,42	10,29	8,48	10,09
R Horrat	0,70	0,90	0,90	1,20	0,80	1,10

Таблица 4 – Магний

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Допущено	15,00	15,00	14,00	14,00	13,00	14,00
Повторов	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
V станд. (мг/л)	65,30	72,03	82,15	80,01	62,63	65,53
Предел повторяемости - r	3,43	4,29	10,27	7,25	5,32	2,27
RSD r (%)	1,90	2,10	4,40	3,20	3,00	1,20
RSD r Horwitz	5,63	5,55	5,44	5,46	5,67	5,63
r Horrat	0,30	0,40	0,80	0,60	0,50	0,20
Предел воспроизводимости - R	15,26	16,33	29,80	20,23	15,86	13,74
RSD R (%)	8,30	8,00	12,80	8,90	8,90	7,40
RSD R Horwitz	8,53	8,40	8,24	8,27	8,58	8,53
R Horrat	1,00	1,00	1,60	1,10	1,00	0,90

Таблица 5 – Алюминий

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего Допущено Повторов	15,00 10,00 2,00	15,00 9,00 2,00	15,00 8,00 2,00	15,00 8,00 2,00	15,00 9,00 2,00	15,00 8,00 2,00
V станд. (мг/л)	0,50	1,19	0,81	1,82	1,65	0,80
Предел повторяемости - r RSD r (%) RSD r Horwitz r Horrat	0,19 13,10 11,71 1,10	0,11 3,30 10,29 0,30	0,22 9,40 10,89 0,90	0,15 2,80 9,65 0,30	0,15 3,20 9,79 0,30	0,05 2,10 10,93 0,20
Предел воспроизводимости - R RSD R (%) RSD R Horwitz R Horrat	0,42 29,80 17,75 1,70	0,33 10,00 15,59 0,60	0,33 14,20 16,50 0,90	0,46 8,90 14,61 0,60	0,97 20,80 14,84 1,40	0,41 18,10 16,56 1,10

Таблица 6 – Железо

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего Допущено Повторов	10,00 6,00 2,00	10,00 7,00 2,00	10,00 7,00 2,00	10,00 6,00 2,00	10,00 7,00 2,00	10,00 7,00 2,00
V станд. (мг/л)	2,86	1,71	4,90	4,55	3,03	4,63
Предел повторяемости - r RSD r (%) RSD r Horwitz r Horrat	0,19 2,30 9,02 0,30	0,06 1,30 9,74 0,10	0,57 4,10 8,31 0,50	0,33 2,60 8,41 0,30	0,21 2,40 8,94 0,30	0,70 0,50 8,38 0,10

Предел воспроизводимости - R	0,20	0,29	0,99	0,34	0,34	2,52
RSD R (%)	2,50	6,10	7,10	2,60	3,90	19,20
RSD R Horwitz	13,66	14,76	12,59	12,74	13,54	12,70
R Horrat	0,20	0,40	0,60	0,20	0,30	1,50

Таблица 7– Медь

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего	9,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Допущено	7,00	10,00	8,00	10,00	8,00	10,00
Повторов	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
V станд. (мг/л)	0,04	0,71	0,46	0,12	0,73	0,12
Предел повторяемости - r	0,03	0,10	0,08	0,05	0,03	0,10
RSD r (%)	24,30	4,80	6,00	14,40	1,70	29,00
RSD r Horwitz	16,95	11,12	11,87	14,62	11,07	14,55
r Horrat	1,40	0,40	0,50	1,00	0,20	2,00
Предел воспроизводимости - R	0,03	0,21	0,09	0,05	0,14	0,10
RSD R (%)	24,30	10,40	6,80	16,40	6,80	30,10
RSD R Horwitz	25,68	16,84	17,98	22,15	16,77	22,05
R Horrat	0,90	0,60	0,40	0,70	0,40	1,40

Таблица 8 – Стронций

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Допущено	7,00	7,00	7,00	6,00	7,00	6,00
Повторов	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
V станд. (мг/л)	1,27	0,22	0,28	1,32	1,73	0,22

Предел повторяемости - r	0,03	0,01	0,04	0,06	0,12	0,00
RSD r (%)	1,00	1,70	5,50	1,70	2,60	0,50
RSD r Horwitz	10,19	13,25	12,76	10,13	9,72	13,30
r Horrat	0,01	0,10	0,40	0,20	0,30	0,00
Предел воспроизводимости - R	0,18	0,07	0,12	0,09	0,24	0,12
RSD R (%)	5,10	11,40	15,30	2,50	5,00	20,00
RSD R Horwitz	15,44	20,08	19,34	15,34	14,73	22,15
R Horrat	0,30	0,60	0,80	0,20	0,30	1,00

Таблица 9 – Барий

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Допущено	7,00	8,00	8,00	7,00	8,00	8,00
Повторов	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
V станд. (мг/л)	0,08	0,64	0,12	0,62	0,11	0,34
Предел повторяемости - r	0,01	0,38	0,01	0,16	0,01	0,06
RSD r (%)	5,70	21,00	3,60	9,20	3,30	6,30
RSD r Horwitz	15,33	11,30	14,52	11,34	14,73	12,41
r Horrat	0,40	1,90	0,20	0,80	0,20	0,50
Предел воспроизводимости - R	0,04	0,38	0,05	0,54	0,05	0,24
RSD R (%)	18,80	21,00	13,90	30,07	15,80	24,50
RSD R Horwitz	23,23	17,12	22,00	17,18	22,32	18,80
R Horrat	0,80	1,20	0,60	1,80	0,70	1,30

Таблица 10 – Марганец

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**

Всего Допущено Повторов	10,00 9,00 2,00	10,00 10,00 2,00	10,00 9,00 2,00	10,00 10,00 2,00	10,00 8,00 2,00	10,00 8,00 2,00
V станд. (мг/л)	1,84	1,12	1,81	1,10	0,11	1,62
Предел повторяемости - r RSD r (%) RSD r Horwitz r Horrat	0,09 1,60 9,64 0,20	0,21 6,50 10,38 0,60	0,49 9,60 9,66 1,00	0,14 4,50 10,41 0,40	0,13 4,60 10,55 0,40	0,60 1,30 9,82 0,10
Предел воспроизводимости - R RSD R (%) RSD R Horwitz R Horrat	0,25 4,80 14,60 0,30	0,21 6,50 15,73 0,40	0,49 9,60 14,63 0,70	0,22 7,10 15,78 0,50	0,22 7,10 15,98 0,30	0,38 8,30 14,88 0,60

Таблица 11 – Цинк

Статистические параметры	**Белое вино 1**	**Белое вино 2**	**Красное вино 1**	**Красное вино 2**	**Сладкое вино 1**	**Сладкое вино 2**
Всего Допущено Повторов	10,00 7,00 2,00	10,00 8,00 2,00	10,00 9,00 2,00	10,00 8,00 2,00	10,00 7,00 2,00	10,00 7,00 2,00
V станд. (мг/л)	1,40	2,12	0,95	1,68	1,53	1,18
Предел повторяемости - r RSD r (%) RSD r Horwitz r Horrat	0,09 2,40 10,03 0,20	0,16 2,60 9,43 0,30	0,22 8,40 10,65 0,80	0,10 2,20 9,77 0,20	0,18 4,20 9,91 0,40	0,05 1,60 10,30 0,20
Предел воспроизводимости - R RSD R (%) RSD R Horwitz R Horrat	0,10 2,40 15,20 0,20	0,39 6,50 14,28 0,50	0,29 10,70 16,13 0,70	0,36 7,60 14,80 0,50	0,22 5,10 15,01 0,30	0,22 6,70 15,61 0,40

2/ Лаборатории-участники:
В этом совместном исследовании приняли участие 11 лабораторий:

- Государственная главная лаборатория, лаборатория NMR, Никосия Кипр
- ANALAB CHILE S.A., Сантьяго Чили
- CISTA, Национальная референс-лаборатория Брно, Чешская Республика
- Лаборатория анализов - REQUIMTE- FCT/UNL, Капарика Португалия
- Центральная лаборатория анализов - Университет Авейру Португалия
- Лаборатория Национального центра тестирования алкогольных напитков, Кишинев Республика Молдова
- Национальный научно-исследовательский институт пивоварения, Хигасихиросима, Япония
- Национальный институт виноградарства, общая лаборатория, Мендоса, Аргентина
- Лаборатория виноградарства и плодоводства LFZ, Клостернойбург, Австрия
- Арбитражная лаборатория Агроалиментарио, Мадрид Испания
- Лаборатория SCL Бордо-Пессак Франция

Метод OIV-MA-AS323-01A Метод IV-го типа

Определение мышьяка в вине с помощью атомно- абсорбционного спектрометра

(Резолюция Oeno 14/2002)

1. Сущность метода

После выпаривания этилового спирта и восстановления мышьяка V в мышьяк III, мышьяк в вине измеряется методом гидридной генерации и атомно-абсорбционной спектрометрии.

2. ОБОРУДОВАНИЕ

1.1. Стеклянная посуда:

1.1.1. Градуированная колба 50, 100 мл (класс A)

1.1.2. Градуированные пипетки 1, 5, 10, 25 мл (класс A)

2.2. Водяная баня при 100°C

2.3. Фильтры без золы

2.4. Спектрофотометр:

2.4.1. Атомно-абсорбционный спектрофотометр

2.4.2. Инструментальные параметры

2.4.2.1. Воздушно-ацетиленовое окислительное пламя

2.4.2.2 Лампа с полым катодом (мышьяк)

2.4.2.3. Длина волны: 193,7 нм

2.4.2.4. Ширина щели: 1,0 нм

2.4.2.5. Интенсивность лампы с полым катодом: 7 мА

2.4.2.6. Коррекция неспецифического поглощения с помощью дейтериевой лампы

2.5. Комплектующие:

2.5.1. Гидридная абсорбционная ячейка, помещенная на воздушно-ацетиленовую горелку.

2.5.2. Парогенератор (сепаратор жидкого газа)

2.5.3. Нейтральный газ (аргон)

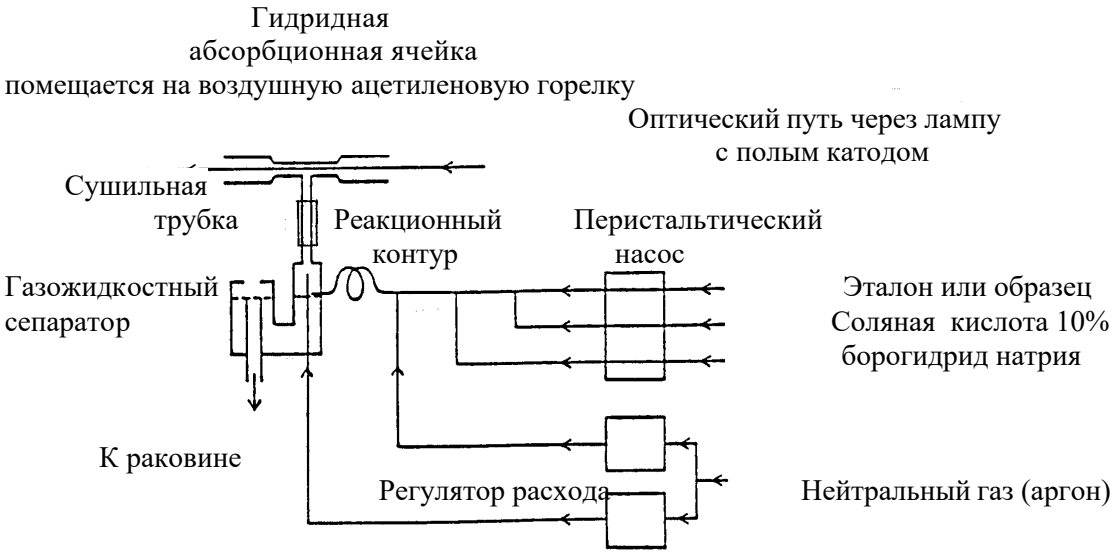


Рисунок 1. Гидридный генератор.

3. РЕАКТИВЫ

3.1. Сверхчистая деминерализованная вода
3.2. Сверхчистая 65% азотная кислота
3.3 Йодистый калий (KI)
3.4 10% Йодистый калий (м/об)
3.5 Концентрированная соляная кислота (R)
3.6 10% соляная кислота (R)
3.7 Борогидрид натрия ($NaBH_4$)
3.8 Гидроксид натрия (NaOH)
3.9 0,6% борогидрид натрия (содержащий гидроксид натрия: 0,5% (м/об))
3.10 Хлорид кальция $CaCl_2$ (используется в качестве сушильного агента)

3.11 1 г/л исходного раствора мышьяка, приготовленного следующим образом: растворяют 1,5339г AS_2O_5 в деминерализованной воде, доводят до 1 л.

3.12 Раствор мышьяка 10 мг/л: помещают 1 мл исходного раствора (3.11.) в 100 мл колбу (2.1.1.); добавляют 1 % азотной кислоты (3.2.); дополняют до объема деминерализованной водой (3.1.).

3.13 100 мкг/л раствора мышьяка: помещают 1 мл 10 мг/л раствора мышьяка (3.12.) в 100 мл колбу (2.1.1.); доливают до объема деминерализованной водой (3.1.).

3.14 Набор каллибровочных стандартов: 0, 5,10, 25 мкг/л
Последовательно помещают 0, 5, 10, 25 мл 100 мкг/л раствора мышьяка (3.13.) в 4 колбы по 100 мл (2.1.1.); добавляют в каждую колбу 10 мл 10% йодистого калия (3.4.) и 10 мл концентрированной соляной кислоты (3.5.); оставляют на 1 час, доливают до 100 мл деминерализованной водой.

4. ПОДГОТОВКА ПРОБ

Берут 25 мл воды и выпаривают на водяной бане при 100 °C. Доводят до 50 мл в присутствии 5 мл 10% йодистого калия и 5 мл концентрированной соляной кислоты; оставляют на 1 час; фильтруют на беззольном фильтре.
Готовят пустой контрольный образец.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Перистальтический насос всасывает раствор борогидрида, 10% раствор соляной кислоты и раствор образца.
Последовательно вводят калибровочные стандарты (3.14.); снимают показания абсорбции в течение 10 секунд; снимают два показания; операционная программа строит калибровочную кривую (абсорбция в зависимости от концентрации мышьяка в мкг/л).
Затем вводят образцы (4); программа установит концентрацию мышьяка в образце в мкг/л; вычтет концентрацию мышьяка в вине в мкг/л с учетом разбавления раствора до 1 / 2.

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроля качества достигают путем регулярного помещения контрольного образца внутреннего качества (*), через 5 проб, или же после помещения в калибровочный раствор, в середине или конце серии измерений.
Учитывают два вида отклонений по отношению к известному значению.
(*) Образцы из Коммунального справочного бюро (Bureau Communautaire de Référence): красное вино, сухое белое вино и сладкое белое вино.

7. БИБЛИОГРАФИЯ

Varian Techtron, 1972. Analytical methods for flame spectroscopy.
Hobbins B., 1982. Arsenic Determination by Hydride Generation. Varian Instruments at Work.
Le Houillier R., 1986. Use of Drierite Trap to Extend the Lifetime of Vapor Generation Absorption Cell. Varian Instruments at Work. Varian, 1994. Vapor Generation Accessory VGA-77.

Метод OIV-MA-AS323-01B Метод IV-го типа

Мышьяк

(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Сущность метода

После минерализации с использованием серной и азотной кислоты, мышьяк V восстанавливается до мышьяка III при помощи йодистого калия в соляной кислоте, и далее мышьяк превращается в гидрид мышьяка III (H_3As) при помощи борогидрида натрия. Образовавшийся гидрид мышьяка III переносится газообразным азотом и определяется методом безпламенной атомно-абсорбционной спектрофотометрии при высокой температуре.

2. Метод

2.1. Оборудование

2.1.1. Колба Кьельдаля (боросиликатное стекло)

2.1.2. Атомно-абсорбционный спектрофотометр, оснащенный мышьяковой лампой с полым катодом, гидридным генератором, корректором фона и самописцем.

Генератор гидридов включает в себя реакционную колбу (которая ставится на магнитную мешалку), соединенную с трубкой подачи газа азота (расход: 11 л/мин) и с второй трубкой - кварцевой ячейкой, которая доводится до температуры 900ºC. Реакционная колба имеет отверстие для введения реагента (борогидрида).

2.2. *Реактивы*

Все реактивы должны быть признаны аналитически чистыми, и в частности, свободными от мышьяка. Дважды дистиллированную воду или воду аналогичной чистоты наливают в колбу из боросиликатного стекла.

2.2.1. Соляная кислота (ρ 20 = 1.84 г/мл) не содержащая мышьяка

2.2.2. Азотная кислота (ρ 20 = 1,38 г/мл), не содержащая мышьяка

2.2.3 . Соляная кислота (ρ 20 = 1,19 г/мл), не содержащая мышьяка

2.2.4. 10% (м/об) раствор йодистого калия

2.2.5. 2,5% (м/об) раствор борогидрида натрия, полученный путем растворения 2,5 г борогидрида натрия в 100 мл 4 % (м/об) раствора гидроксида натрия. Данный раствор должен быть приготовлен к моменту использования.

2.2.6 Эталонный раствор мышьяка 1 г/л. Предпочтительно использовать коммерческий стандартный раствор мышьяка.

В качестве альтернативы можно приготовить раствор в объемной колбе на 1000 мл, растворив 1,320 г триоксида мышьяка III As_2O_3 в минимальном объеме 20 % (*m/v*) гидроксида натрия. Затем раствор подкисляется соляной кислотой, разбавленной на 1/2, и доводится до 1 л водой.

2.3 *Выполнение исследования*

2.3.1 Минерализация

Помещают 20 мл вина в колбу Кьельдаля, кипятят и уменьшают объем вдвое, чтобы удалить спирт. Дают остыть. Добавляют 5 мл серной кислоты, медленно добавляют 5 мл азотной кислоты и нагревают. Как только жидкость станет коричневой, добавляют по каплям достаточное количество азотной кислоты для осветления жидкости при медленном кипении. Продолжают до тех пор, пока цвет не станет прозрачным и над раствором не появятся белые пары триоксида серы.

Дают остыть, добавляют 10 мл дистиллированной воды и снова доводят до кипения, кипятят на медленном огне до тех пор, пока пары оксида азота и триоксида серы не перестанут выделяться. Дают остыть и повторяют операцию.

После остывания разбавляют остаток серной кислоты несколькими миллилитрами дистиллированной воды. Количественно переносят раствор в колбу на 40 мл, ополаскивают колбу водой, соединяют с разбавленным остатком и доводят до метки дистиллированной водой.

2.3.2 Экспериментальное определение

2.3.2.1 Приготовление раствора

Помещают 10 мл раствора минерализации (2.3.1) в колбу реактора гидридного генератора. Добавляют 10 мл соляной кислоты, 1,5 мл раствора йодида калия, затем включают магнитную мешалку и газообразный азот (скорость потока: 11 л/мин). Через 10 сек добавляют 5 мл раствора борогидрида натрия. При помощи газа-носителя азота получаемые пары гидрида будут направляться в измерительную ячейку (при температуре 900ºC), где происходит диссоциация соединения и распыления мышьяка.

2.3.2.2 Приготовление стандартных растворов

Из эталонного раствора мышьяка (2.2.6) готовят растворы с соответствующей концентрацией мышьяка 1, 2, 3, 4 и 5 мкг на 1 литр. Помещают 10 мл каждого из приготовленных растворов в колбу реактора гидридного генератора и анализируют в соответствии с п. 2.3.2.1.

2.3.2.3 Измерения

Выбирают длину волны поглощения 193,7 нм. Обнуляют спектрофотометр, используя для этого двойную дистиллированную воду, производят все замеры в двух экземплярах.

Записывают абсорбцию каждого образца и стандартного раствора. Рассчитывают среднее значение абсорбции для каждого из этих растворов.

2.4 Выражение результатов

2.4.1 Расчеты

Строят кривую, показывающую изменение поглощения в зависимости от концентрации мышьяка в стандартных растворах. Зависимость линейная. Отмечают на графике среднее значение поглощения растворов образцов и определяют концентрацию мышьяка C.

Концентрация мышьяка в вине, выраженная в микрограммах на литр, определяется по формуле: 2 C.

BIBLIOGRAPHY

JAULMES P. et HAMELLE G., *Trav. Soc. Pharm. Montpellier,* 1967, **27**, n^{o} 3, 213-225.

JAULMES P., *F.V., O.I.V.,* 1967, n^{o} 238

MEDINA B et SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1983, n^{o} 770.

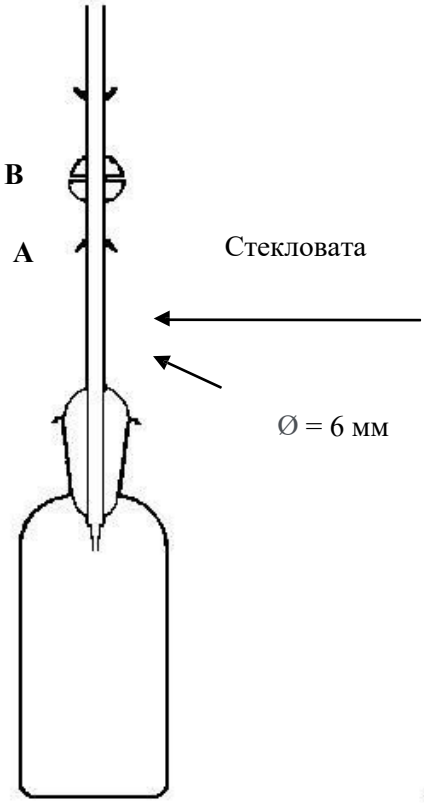


Рис.1: Аппаратура, используемая для определения предельного содержания мышьяка

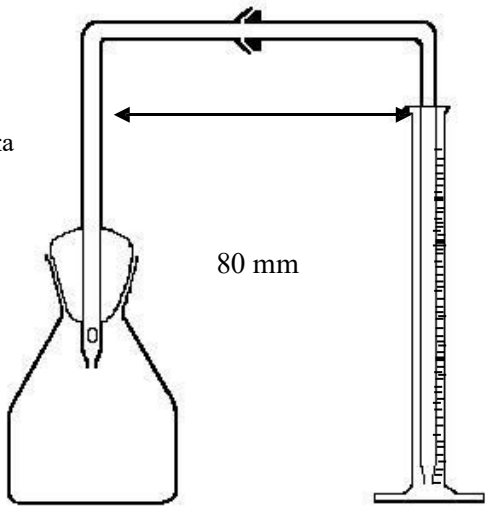


Рис.2: Аппаратура, используемая для определения мышьяка

Метод OIV-MA-AS323-01C

Мышьяк
(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Сущность метода

После минерализации с использованием серной и азотной кислот мышьяк V восстанавливается до мышьяка III с помощью хлорида олова II. Затем мышьяк превращается в гидрид мышьяка III под действием выделяющегося водорода. Гидрид мышьяка III обнаруживается по реакции с бромидом ртути II (предельный образец).

МЕТОД УДАЛЕН

Метод OIV-MA-AS323-02A Метод II типа

Количественное определение суммарного азота по методу Дюма (сусла и вина)

(Резолюция Oeno 13/2002)

1 - ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данный метод может быть применен для анализа общего содержания азота в сусле и вине в пределах от 0 до 1000 мг/л.

2 - ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ

2.1 - Сущность метода Дюма

Анализ общего содержания азота в органической матрице может быть проведен по методу Дюма (1831). При этом происходит полное сжигание матрицы под воздействием кислорода. Образующиеся пары восстанавливаются медью и высушиваются, а CO_2 улавливается. Азот количественно определяется с помощью универсального детектора.

2.2 - Сущность анализа (Рисунок n° 1)

- Введение образца и кислорода в трубку для сжигания при температуре 940°C (1) ;
- Сжигание типа "Вспышка" (2) ;
- В результате сгорания лодочки с кольцом (3) температура временно повышается до 1800°C ;
- Дополнительное окисление и галогенные ловушки на серебряном кобальте и гранулированном сесквиоксиде хрома (4) ;
- Восстановление оксидов азота N_2 и улавливание компонентов серы и избыточного кислорода медью при 700°C (5) ;
- Газы в гелии включают: N_2, CO_2 и H_2O (6) ;
- Улавливание неизмеряемых элементов: H_2O с помощью ангидрона (гранулированный безводный перхлорат магния) (7) и CO_2 аскарита (гидроксид натрия на кремнеземе) (8) ;
- Хроматографическое разделение азота и метана, возможно, присутствует после очень большого пробного поглощения (9);
- Обнаружение посредством катарометра (10) ;

- Сбор сигналов и обработка данных (11).

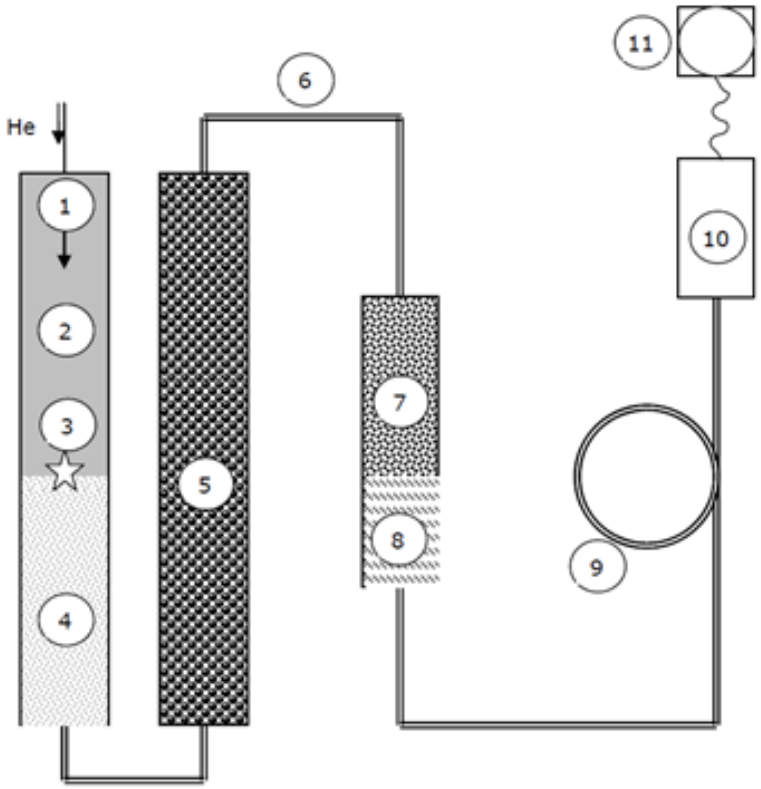


Рисунок 1: Схема принципа анализа

3 - Реагенты и приготовление реактивных растворов

3.1 - азот (технического качества) ;
3.2 - гелий (чистота 99,99994%) ;
3.3 - оксид хрома (сесквиоксид хрома в гранулах) ;
3.4 - оксид кобальта (гранулированный кобальто-кобальтовый оксид серебра);
3.5 - кварцевая вата;
3.6 - медь (восстановленная медь в струнах);
3.7 - аскарит (гидроксид натрия на кремнеземе);

3.8 - ангидрон (гранулированный безводный перхлорат магния);
3.9 - кислород (чистота 99,995%);
3.10 - атропин;
3.11 - глумат-гидрохлоридная кислота;
3.12 - деминерализованная вода;
3.13 - жестяная ванночка.

4 - Оборудование

4.1 - центрифуга с 25 мл банками;
4.2 - газоанализатор концентраций азота;
4.3 - металлический тигель;
4.4 - кварцевая пробирка для реакций (2) ;
4.5 - высокоточные весы от 0,5 мг до 30 г при ± 0,3 мг ;
4.6 - держатель лодочки;
4.7 - печь;
4.8 - приспособление для складывания лодочек;
4.9 - приспособление для смены проб;
4.10 - компьютер и принтер.

5 - ОТБОР ПРОБ

Дегазируют игристое вино путем барботирования азотом (3.1) в течение 5-10 мин. Сусло центрифугируют (4.1) в течение 10 мин при 10°C, 4200 г.

6 – Выполнение исследования

- Запускают программу аппарата (4.2 и 4.10);
- Включают нагрев аппарата (4.2).

6.1 - Основные параметры лабораторного анализа

Анализатор азота (4.2) при следующих условиях:

- Газовый носитель: гелий (3.2) ;
- металлический тигель (4.3) который опорожняют после каждых 80 анализов ;

- пробирка для окисления (4.4), нагретая до 940° C, содержащая оксид хрома (3.3) и оксид кобальта (3.4), удерживаемые кварцевой ватой (3.5). Пробирку и набор реагентов необходимо менять каждые 4000 анализов;
- редукционная трубка (4.4), нагретая до 700° C, содержащая медь (3.6), удерживаемую кварцевой ватой (3.5). Медь меняется каждые 450 анализов;
- поглотительная трубка, содержащая 2/3 аскарита (3.7) и 1/3 ангидрона (3.8). Аскарит, который берется блоком, удаляется и заменяется каждые 200 анализов. Поглотители меняются полностью 1 раз в год.
- Чем больше органических веществ, подлежит сжиганию, тем больше требуется кислорода: клапан отбора проб кислорода (3.9) открывают на 15 секунд для сусла и 5 секунд для вина.

ПРИМЕЧАНИЕ: Металлы восстанавливаются и отправляются в центр для уничтожения, или же подвергаются специальной переработке.

6.2 - Подготовка стандартной шкалы

Готовят два образца атропина (3.10) от 4 до 6 мг. Взвешивают их (4.5) прямо в лодочке. Калибровочная шкала проходит через 3 точки (вначале = пустая лодочка).

6.3 - Подготовка внутренних стандартов

Внутренние стандарты постоянно используются в начале и в середине анализа.

- Внутренние проверки проводятся с использованием глутаминовой кислоты в форме гидрохлорида при 600 мг N/л в деминерализованной воде (3.12).

  Молярная масса глутаминовой кислоты = 183,59
  Молярная масса азота = 14,007

$$\frac{183{,}59\text{x}0{,}6}{14{,}007} = 7.864\,\frac{\text{г}}{\text{л}}$$

- Взвешивают (4,5) 7,864 г глутаминовой кислоты (3.11) и разводят в деминерализованной воде (3.12) qsp/л, чтобы получить раствор 600 мг N/l. Этот раствор разбавляют на 50% для получения раствора 300 мг N/л, который снова разбавляют на 50% для получения раствора 150 мг/л.

6.4 - Подготовка образцов:

6.4.1 - В лодочке (3.13) взвешивают (с точностью до 0,01 мг) 20 мкл сусла или 200 мкл вина с помощью прецизионных весов (4.5). Повторяют эту процедуру три раза для каждого образца;
6.4.2 – Записывают вес каждого образца
6.4.3 - Постепенно укладывают лодочки в держатель (4.6) ;
6.4.4 - Помещают лодочки в печь (4.7) при установленной температуре ~ 60° C, держат до полного испарения жидкости (для этого требуется не менее одного часа);
6.4.5 - Складывают и разламывают лодочки с помощью соответствующего аппарата (4.8), помещают их в сменное устройство (4.9) по номерам.

7 - ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты выражаются в г/л с точностью до четвертого десятичного знака.

8 - ПРОВЕРКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Непрямое сопряжение по массе, температуре и объему.

9 - ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА

Количество лабораторий	Среднее содержание	Повторяемость	Воспроизводимость
11	591 мг/л	43 мг/л	43 мг/л

10 - БИБЛИОГРАФИЯ

Dumas A. (1826) : Annales de chimie, 33,342.

Buckee G.K. (1994) : Determination of total nitrogen in Barley, Malt and Beer by Kjeldahl procedures and the Dumas combustion method. Collaborative trial. J. Inst. Brew., 100, 57-64.

Способ OIV-MA-AS323-02B Способ IV-го типа

Суммарный азот
(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Сущность метода

Образец подвергается мокрому озолению с использованием серной кислоты в присутствии катализатора. Аммиак, выделяемый гидроксидом натрия, определяется титриметрически.

2. Оборудование

2.1 Приспособление для сбраживания

Колбу Кьельдаля объемом 300 мл помещают на металлический колбонагреватель. Необходима стойка для удержания прибора, горловина согнута под углом 45 градусов.

2.2 Приспособление для дистилляции

Круглодонная колба объемом 1 л, снабженная небольшой ректификационной колонкой длиной 30 см и диаметром 2,5 см, или любым другим эквивалентным прибором. Пар, выходящий из конца этого аппарата, попадает в верхнюю часть установленного вертикально цилиндрического конденсатора с длинной 30 см и внутренним диаметром 1 см. Конденсированная жидкость поступает в приемную коническую колбу по отводной трубке, расположенной на дне - в качестве альтернативы можно использовать аппарат для паровой дистилляции, описанный в разделе "*Летучая кислотность"*, или любой другой аппарат, относящийся к испытанию, описанному в этом пункте " *Пустые тесты или выборочные тесты*".

3. Реактивы

3.1 Серная кислота, не содержащая аммиака (ρ 20 = 1.83 - 1.84 г/мл)

3.2 Бензойная кислота

3.3 Катализатор:

Медный купорос, $CuSO_4$, ... 10 г
Сульфат калия, K_2SO_4, ... 100 г

3.4 30% раствор гидроксида натрия. Натрия гидроксид (ρ_{20} =1,33 г/мл) разбавленный 30% (*м/м*).

3.5 0,1 М раствор соляной кислоты

3.6 Индикатор:

Метиловый красный.....100 мг
Метиленовый синий..... 50 мг
Этанол (50%) 100мл

3.7 Раствор борной кислоты:

Борная кислота ..... 40 г
Вода до ..... 1000 мл

Этот раствор станет розовым при добавлении 5 капель метила красного и 0,1 мл или более 0,1 М раствора соляной кислоты.

3.8 Раствор сульфата аммония:

Сульфат аммония $(NH_4)_2SO_4$..... 6.608 г
Вода ..... 1000 мл

3.9 Триптофан, $C_{11}H_{12}O_2N_2$, (теоретически, это вещество содержит 13.72 г азота на 100 г)

4. Выполнение исследования

Помещают в колбу Кьельдаля объемом 300 мл (2.1) 25 мл вина, 2 г бензойной кислоты (3.2) и 10 мл серной кислоты (3.1). Добавляют от 2 до 3 г катализатора. Поместив колбу на металлический колбонагреватель (2.1) и наклонив горлышко под углом 45 градусов, нагревают до получения прозрачного цвета. Продолжают нагревать еще 3 минуты.

После охлаждения осторожно переносят содержимое колбы Кьельдаля в круглодонную колбу емкостью 1 л, содержащую 30 мл воды. Промывают колбу Кьельдаля несколько раз водой и добавляют промывку в круглодонную колбу. Охлаждают колбу; для обеспечения щелочности раствора добавляют 1 каплю 1% раствора фенолфталеина и достаточное количество 30% раствора гидроксида натрия (3,4) (примерно 40 мл), постоянно охлаждая колбу во время добавления. Перегоняют 200-250 мл в колбу, содержащую 30 мл 40 г/л раствора борной кислоты.

Титруют дистиллированный аммиак в присутствии 5 капель индикатора (3.6) с использованием при этом 0,1 М раствора соляной кислоты.

Примечание: Для получения быстрой отгонки аммиака можно использовать контрольный тренажер, как описано в главе о летучей кислотности. В этом случае, перед введением в миксер, последовательно добавляют 40-45 мл 30% раствора гидроксида натрия и 50-60 мл предварительно разбавленного в течение 10 минут в содержимое колбы Кьельдаля.

5. Вычисления

Суммарный азот, в г/л, содержащийся в вине, определяется следующим выражением: 0,56 x *n*, где *n* - объем 0,1 М соляной кислоты.

6. Холостые и контрольные испытания

Все дистилляционные аппараты, используемые для определения аммиака, должны удовлетворять следующим требованиям:

а) Помещают в дистилляционную колбу 40-45 мл раствора гидроксида натрия, 50 мл воды, 2 г бензойной кислоты, 5 г сульфата калия и 10 мл серной кислоты, разбавленной до 50 мл. Дистиллируют 200 мл и собирают

дистиллят в объеме 30 мл раствора 40 г/л борной кислоты. Добавляют к нему 5 капель индикатора (3.6).

Изменение цвета при помощи индикатора должно быть получено добавлением 0,1 мл 0,1 М соляной кислоты раствора.

б) В аналогичных условиях перегоняют 10 мл 0,1 М раствора сульфата аммония. В этом случае от 10,0 до 10,1 мл 0,1 М раствора соляной кислоты необходимо использовать для изменения цвета индикатора.

c) Полный метод (мокрое озоление и дистилляция) проводится с использованием 200 мг триптофана в качестве исходного образца. Используется от 19,5 до 19,7 мл 0,1 М соляной кислоты для достижения изменения цвета.

Метод OIV-MA-AS323-03 Метод IV типа

Бор

Быстрый колориметрический метод

1. Сущность метода

Содержание спирта в вине удаляется путем уменьшения объема вдвое с помощью ротационного выпаривания. Далее вино пропускают через колонку с поливинилпирролидоном, который удерживает красящие вещества. Элюат собирают количественно и определяют концентрацию бора путем связывания с азометином H при pH 5,2 с последующим спектроскопическим анализом при 420 нм.

2. Оборудование

2.1. Ротационный испаритель

2.2. Спектрофотометр, способный измерять длину волны поглощения от 300 до 700 нм.

2.3. Ячейки оптического пути в 1 см.

2.4. Стеклянная колонка с внутренним диаметром 1 см и длиной 15 см, содержащая 8 см слоя поливинилпирролидона.

3. Реактивы

3.1. Азометин H (4-гидрокси-5-(2-гидроксибензилиденамино)-2,7-нафталиндисульфоновая кислота)

3.2. Раствор азометина H

Помещают 1 г азометина H и 2 г аскорбиновой кислоты в объемную колбу на 100 мл и добавляют 50 мл дважды дистиллированной воды. Слегка нагревают до растворения и доводят до метки бидистиллированной водой. Реактив стабилен в течение 2-х дней при хранении в холодном месте.

3.3. Буферный раствор pH 5.2

Растворяют 3 г EDTA (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) в 150 мл дважды дистиллированной воды. Добавляют 125 мл уксусной кислоты (ρ_{20} = 1,05 г/мл) и 250 г ацетата аммония, NH_4CH_3COO, растворяют. Проверяют pH с помощью pH-измерителя и при необходимости регулируют до pH 5,2.

3.4. Рекомендуется использовать стандартный коммерческий раствор.

В качестве альтернативы можно приготовить раствор из 0,571 г борной кислоты H_3BO_3, предварительно высушенной при 50°C до постоянного

веса, растворить ее в 500 мл дважды дистиллированной воды и довести до 1 л.

3.5. Стандартный раствор бора, 1 мг/л

Разбавляют исходный раствор, 100 мг/л (3,4) 1/100 бидистиллированной водой.

3.6. Поливинилпирролидон или ПВПП (см. Международный энологический кодекс)

4. Выполнение исследдования

Удаляют спирт из 50 мл вина путем выпаривания до половины первоначального объема в роторном испарителе при температуре 40°C, доводят объем до 50 мл дважды дистиллированной водой.

Берут 5 мл этого раствора и пропускают его через колонку PVPP (2.4). Красящие вещества полностью сохраняются. Собирают элюат и воду из колонки для промывки, помещают в объемную колбу на 50 мл и доводят водой до нужной метки.

Колориметрическое определение проводят в объеме 5 мл элюента, помещенного в объемную колбу на 25 мл; разбавляют примерно 15 мл дистиллированной водой и добавляют (помешивая после каждого добавления):

5 мл раствора азометина H (3.2)

4 мл буферного раствора с pH 5,2 (3.3)

Доливают до 25 мл бидистиллированной водой.

Ждут 30 мин и определяют абсорбцию As при 420 нм. Нуль шкалы абсорбции устанавливается с помощью дистиллированной воды.

Используют холостой раствор, состоящий из 5 мл раствора азометина H и 4 мл буферного раствора pH 5,2, растворенных в 25 мл бидистиллированной воды. Ждут 30 минут и подсчитывают абсорбцию Ab при тех же условиях. Абсорбция должна заключаться в пределах от 0,20 до 0,24; более высокая абсорбция свидетельствует о загрязнении бором воды или реагентов.

Подготовка калибровочной кривой

В объемные колбы вместимостью 25 мл помещают от 1 до 10 г бора, что соответствует от 1 до 10 мл стандартного раствора бора 1 мг/л (3.5) и продолжают, как указано в п. 4.0. Калибровочный график, представляющий чистую абсорбцию (A_S - Ab) в зависимости от концентрации, представляет собой прямую линию, проходящую через начало координат.

Где: A_S = абсорбция образца

Ab = абсорбция образца

5. Вычисления

Количество бора в мкг, содержащегося в 5 мл элюата (что соответствует 0,5 мл вина) и полученного при интерполяции значений нетто-абсорбции (A_S - A_b) на калибровочном графике, равно E. Содержание B в миллиграммах бора на литр определяется формулой

$$\frac{Bmg}{L} = \frac{\mathrm{E}}{0{,}5}$$

БИБЛИОГРАФИЯ

WOLF B., *Soil Science and Plant Analysis*, 1971, **2**(5), 363-374 et 1974, **5**(1), 39-44.
CHARLOT C. and BRUN S., *F.V., O.I.V.*, 1983, n°771.

Метод OIV-MA-A323-04A1 Метод IV типа

Свободная двуокись серы
(Резолюция OIV-OENO 661-2021)

1 Область применения

Данный метод предназначен для определения свободной двуокиси серы в вине и сусле.

2 Определение

Свободная двуокись серы присутствует в сусле или вине в следующих формах: H_2SO_3 и HSO^-, равновесие которых зависит от pH и температуры:

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

H_2SO_3 представляет собой молекулярный диоксид серы.

3 Сущность метода

Диоксид серы увлекается потоком воздуха или азота, связывается и окисляется при пропускании через разбавленный нейтральный раствор перекиси водорода.

Образовавшуюся серную кислоту выявляют титрованием стандартным раствором гидроксида натрия.

Поскольку количество выделившегося диоксида серы сильно зависит от температуры, принято решение работать при комнатной температуре (от 18 до 24 °C). Данная температура, как и температура потоков воздуха и азота, должна поддерживаться постоянной на протяжении всего процесса определения.

4 Реактивы и продукты

4.1 Чистая фосфорная кислота 85% (ρ_{20} = 1.71 г/мл) (CAS no. 7664-38-2)

4.2 Разбавленная фосфорная кислота (~25.5%):

В качестве примера: Разбавляют 300 мл фосфорной кислоты 85% (4.1) в 1 л воды для аналитического использования

4.3 Индикаторный реактив:

Метиловый красный (CAS no. 493-52-7)	100 мг(±1мг)
Метиленовый синий (CAS no. 7220-79-3)	50 мг (±0.5 мг)

Этанол (≥ 95%) (CAS no. 64-17-5) 50 мл

Доводят объем до 100 мл водой аналитического качества. Соблюдают пропорции объемов, отличных от 100 мл.

Можно использовать коммерческие индикаторные реактивы похожего состава.

4.4 1 М гидроксида натрия (3,84%), или в безводной форме (гранулы) (CAS no. 1310-73-2)

4.5 0.01 М раствора гидроксида натрия:

Пример: Разбавляют 10,0 мл 1 М гидроксида натрия (4,4) в 1 л воды аналитического качества.

При необходимости регулярно проверяют титр раствора (применяют поправочный коэффициент) и держат его подальше от атмосферного CO_2.

4.6 Раствор перекиси водорода в 3 объемах (= 9,1 г/л = 0,27 моль/л H_2O_2), приготовленный или доступный в продаже (например, 30% H_2O_2: смесь по CAS №7722-84-1)

Примечание: раствор 30 % по массе соответствует титру 110 объемов (ρ_{20} = 1,11 г/мл), что означает объем кислорода, идеально выделяемого на литр H_2O_2 при стандартных условиях температуры и давления, в то время как раствор 3% по массе (ρ_{20} = 1 г/мл) соответствует титру 10 объемов (0,89 моль/л). Таким образом, подготовка зависит от используемого коммерческого раствора и учитывает факт, что в любом случае, используемый в методе объем будет избыточным.

5 Оборудование

Используемый аппарат должен соответствовать приведенной ниже схеме, особенно это касается конденсатора.

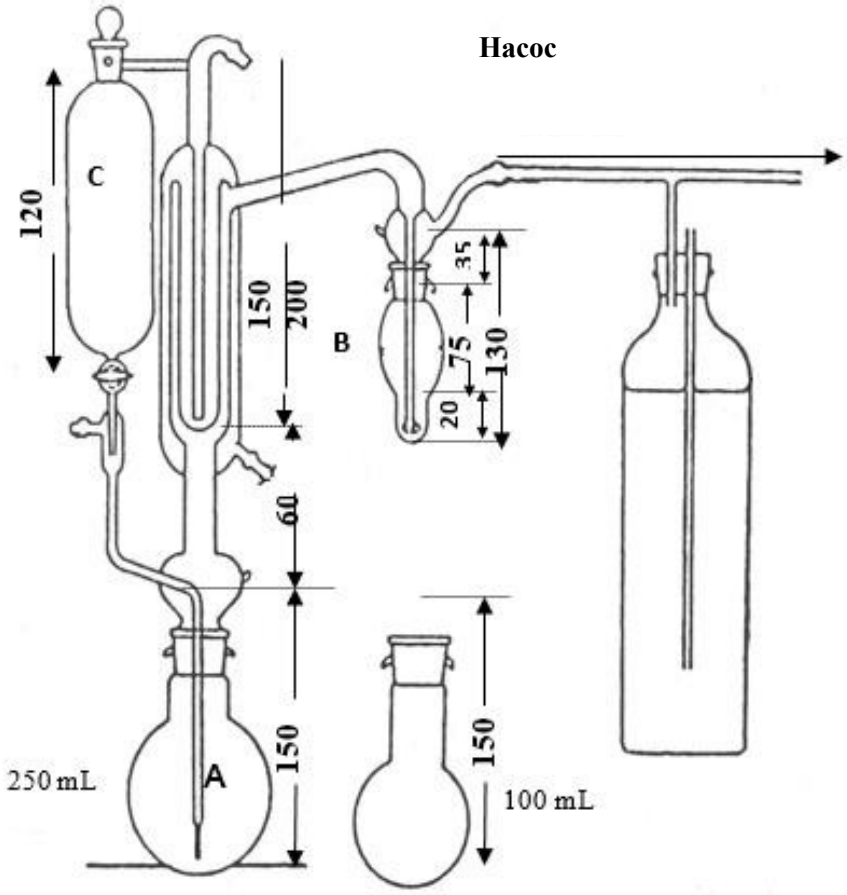
Трубка подачи газа к барботеру **B** заканчивается маленькой сферой диаметром в 1 см с 20 отверстиями диаметром в 0,2 мм, расположенными горизонтально вокруг большой окружности. В качестве альтернативы трубка может заканчиваться пластиной из стеклокерамики, в которой образуется большое количество мелких пузырьков и тем самым обеспечивается хороший переход от жидкой к газообразной фазе.

Скорость потока газа через аппарат должна составлять примерно 40 л/ч. Бутылка, расположенная справа от аппарата, предназначена для ограничения снижения давления, до 20-30 см вод. ст., создаваемого водяным насосом Чтобы регулировать снижение давления и добиться его надлежащего расхода, рекомендовано установить расходомер с полукапиллярной трубкой между барботером и бутылкой.

Колбу **A** следует поддерживать при температуре от 18 °C до 24 °C на протяжении всего процесса удаления жидкости. Каждая колба, соответственно, должна иметь температурный контроль (например, с помощью термостатической бани), если комнатная температура в

лаборатории не находится в этих пределах или если используется 85% фосфорная кислота, которая может значительно повысить температуру в колбе во время ее добавления.

Рисунок 1 - Размеры указаны в миллиметрах. Внутренние диаметры 4-х концентрических трубок конденсатора составляют 45, 34, 27 и 10 мм.



6 Выполнение исследования

Перед каждым новым определением рекомендуется промывать аппарат воздухом или азотом (например, в течение 5 минут). Если проводится холостой тест, цвет индикатора в нейтрализованном растворе перекиси водорода не должен измениться на выходе из газоподводящей трубки.

- Подключают воду из конденсатора.
- Контролируют температуру в лаборатории или предварительно стабилизируют ванну (при температуре от 18 °C до 24 °C).
- В барботер для забора В аппарата вводят 2-3 мл раствора перекиси водорода (4.6) и 2 капли индикаторного реактива (4.3), нейтрализуют с помощью 0,01 М раствора гидроксида натрия (4,5); нейтральный pH = зеленый цвет.
  Примечание: Для серии больших образцов можно подготовить предварительно нейтрализованный раствор H_2O_2 перед внесением его в колбу. Изменяют концентрацию и объем, учитывая то, что окислительная способность раствора должна сохраняться (уменьшенный срок хранения).
- Присоединяют барботер к аппарату.
- Переносят 50 мл образца в 250-мл колбу **A** и присоединяют ее к прибору.
- Вносят 15 мл разбавленной фосфорной кислоты (4.2) в колбу С.
  Примечание: Если ожидаемая концентрация свободного диоксида серы выше, чем 50 мг/л, необходимо использовать фосфорную кислоту с концентрацией 85% (4.1). Однако следят за тем, чтобы температура в колбе **A** не повышалась во время добавления.
- Открывают кран, чтобы добавить кислоту в пробу, одновременно запустив поток газа и установив таймер на 15 минут. Увлеченный чистый диоксид серы окисляется в серную кислоту.
- Через 15 минут вынимают барботер **B** и промывают трубку подачи газа в воде (через воронку).
- Титруют кислоту, образованную 0,01 М раствора гидроксида натрия (4.5), до достижения зеленого цвета.
- Количество миллилитров выражается через *n*.

7 Формула и выражение результатов

Чистый диоксид серы выражается в миллиграммах на литр (мг/л), в целых числах.

Величина чистого диоксида серы рассчитывается в миллиграммах на литр по формуле: 6,4 *n*

8 Библиография

Paul, F., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein,* 1958, ser. A, 821.

Совместное исследование

Валидация метода определения вободного диоксида серы

1. Область применения

Международное совместное исследование в соответствии с резолюцией OIV-OENO 6-2000 по валидации обновленных методов определения свободного диоксида серы и суммарного диоксида серы (OIV-MA-AS323-04A), решение доп. комиссии МОВВ «Методы и анализы», апрель 2018 г.

2. Нормативные ссылки

- Обновление (проект) методов OIV-MA-AS323-04A,
- ИСО 5725,
- Резолюция OIV-OENO 6-2000.

3. Протокол

Всего было приготовлено 20 образцов с использованием однородных объемов 10 вин из различных винных регионов Франции и Португалии. Каждый образец проверялся дважды (второй - как слепой дубликат), в соответствии с принципом двойного слепого исследования. Образцы были подготовлены в период с 18 по 20 июня 2018 года и отправлены без задержек лабораториям-участникам.

№ образца	№ слепого дублирования	Тип образца
A	1-14	Сухое белое вино
B	2-16	Сухое белое вино
C	3-19	Сухое розовое вино
D	4-12	Сухое розовое вино
E	5-20	Сухое красное вино
F	6-18	Сухое красное вино
G	7-11	Сухое красное вино
H	8-15	Белое ликерное вино
I	9-17	Красное ликерное вино
J	10-13	Красное ликерное вино

Анализы проводились всеми участвующими лабораториями одновременно, в период с 16 по 20 июля 2018 года.

Образцы хранились в холодильных шкафах всеми лабораториями с даты получения до даты анализа, согласно отправленным протоколам.

Свои результаты предоставили следующие лаборатории:

Лаборатория	Город	Страна
Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	Лейро (Оуренсе)	Испания
Laboratorio arbitral agroalimentario	Мадрид	Испания
ASAE	Лиссабон	Португалия
SCL Montpellier	Монпелье Седекс 5	Франция
HBLA und BA für Wein- und Obstbau	Клостернойбург	Австрия
Laboratorio de Salud Pública	Мадрид	Испания
Laboratorio Agroambiental de Zaragoza	Сарагоса	Испания
Laboratoire SCL Bordeaux	Пессак Седекс - CS 98080	Франция
Unione Italiana Vini Servizi	Верона	Италия
Laboratorio Agroalimentario de Valencia	Бурхассот (Валенсия)	Испания
Agroscope	Ньон	Швейцария
Laboratoires Dubernet	Монтредон-де-Корбьер	Франция
Laboratoire Dioenos Rhône	Орандж	Франция
Laboratoire Natoli	Сен-Клеман де Ривьер	Франция

Примечание: с целью сохранения анонимности результатов порядок лабораторий в таблице не соответствует порядку в последующих таблицах.

4. Чистый диоксид серы

4.1 Данные по чистому SO_2

Чистый SO_2	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Образец	**1**	**14**	**2**	**16**	**3**	**19**	**4**	**12**	**5**	**20**	**6**	**18**	**7**	**11**	**8**	**15**	**9**	**17**	**10**	**13**
Лаб 3			31	36	18	18	21	23	20	18	6	6	20	17	5	6				
Лаб 5			37	35	21	24	24	25	20	20	8	7	20	20	3	4				
Лаб 6	4	1	38	33	21	20	20	26	19	20	7	6	21	19	7	8	1	3	1	1
Лаб 7	1	1	37	40	20	22	24	26	20	22	9	8	20	23	8	8	2	1	1	1
Лаб 8			31	32	18	19	23	22	22	20	6	7	19	20	5	3	1	1		
Лаб 9			35	34	23	19	25	24	21	24			17	17						
Лаб 10	2	1	35	34	20	21	24	24	22	21	9	8	21	20	7	7	2	2	1	1
Лаб 11	0	0	33	30	17	11	22	16	16	21	6	4	15	19	6	3	1	1	0	0
Лаб 15			15	19	15	13	18	20	8	16	6	5	8	15	5	5				
Лаб 17	0	0	37	38	24	26	28	28	26	23	8	8	24	22	7	7	1	2	0	0
Лаб 18	0	4	33	31	21	11	23	27	15	19	6	4	9	20	3	4	1	1	0	0
Лаб 20	0	0	32	32	20	19	21	21	29	21	8	8	20	18	12	4	1	1	0	0
Лаб 21	2	1	33	38	19	15	25	22	19	21	6	6	19	20	8	7	2	1	0	0

Результаты, оставленные незаполненными, считались не поддающийся количественному измерению (< предела количественной оценки).

Результат, исключенный тестом Кохрана при 5%

Результат, исключенный тестом Граббса при 5%

4.2 Результаты по чистому SO_2

Чистый SO_2 (мг/л)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Кол-во отобранных лабораторий	7	9	11	10	10	12	11	11	9	8
Количество повторений	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Мин.	0	31.5	14	19	17	5	17	3.5	1	0
Макс.	2.5	38.5	25	28	24.5	8.5	23	8	2	1
Среднее значение	0.9	34.2	19.8	23.4	20.6	6.8	19.6	5.7	1.4	0.4
Стандартное отклонение	0.98	2.67	2.91	2.46	2.04	1.31	1.77	1.72	0.42	0.52
Дисперсия повторяемости	0.79	1.67	2.59	1.20	2.60	0.58	2.23	0.82	0.39	0.00
Межлабор.станд. отклонение	0.98	2.67	2.91	2.46	2.04	1.31	1.77	1.72	0.42	0.52
Дисперсия воспроизводимости	1.35	7.97	9.76	6.64	5.46	2.00	4.25	3.38	0.37	0.27
Станд. отклон. повторяемости	0.89	1.29	1.61	1.10	1.61	0.76	1.49	0.90	0.62	0.00
Предел r	2.48	3.61	4.51	3.07	4.51	2.14	4.18	2.53	1.75	0.00
Повторяемость %CV (k=2)	191	8	16	9	16	23	15	32	90	0
Станд. откл. воспроизводимости	1.16	2.82	3.12	2.58	2.34	1.41	2.06	1.84	0.61	0.52
Предел R	3.25	7.90	8.75	7.22	6.54	3.96	5.78	5.15	1.70	1.45
Воспроизводимость %CV (k=2)	**250**	**16**	**32**	**22**	**23**	**42**	**21**	**64**	**87**	**276**
Horwitz $PRSD_R$ (%)	16.18	9.40	10.21	9.95	10.15	12.00	10.22	12.30	15.23	18.55
Horwitz S_R	0.15	3.22	2.02	2.33	2.09	0.81	2.00	0.70	0.21	0.07
Horwitz R	0.42	9.10	5.71	6.59	5.91	2.29	5.67	1.99	0.60	0.20
Коэффициент Horwitz	7.64	0.87	1.53	1.10	1.11	1.73	1.02	2.58	2.84	7.37

Свободный SO_2: %CV(r) (k=2) в зависимости от концентрации

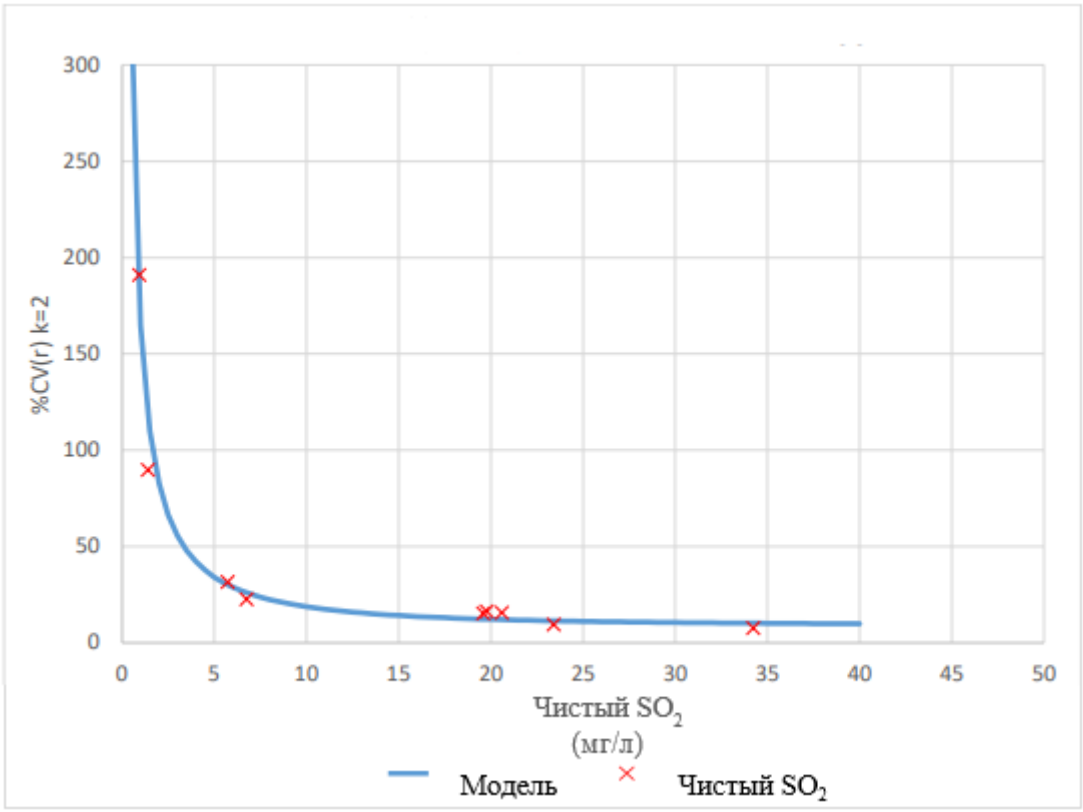


Рисунок 1: Моделирование коэффициента вариации повторяемости, %CV(r) (k=2), в зависимости от концентрации, C:

$$\%CV(r) = \sqrt{\frac{164{,}55^2}{C^2} + 9^2}$$

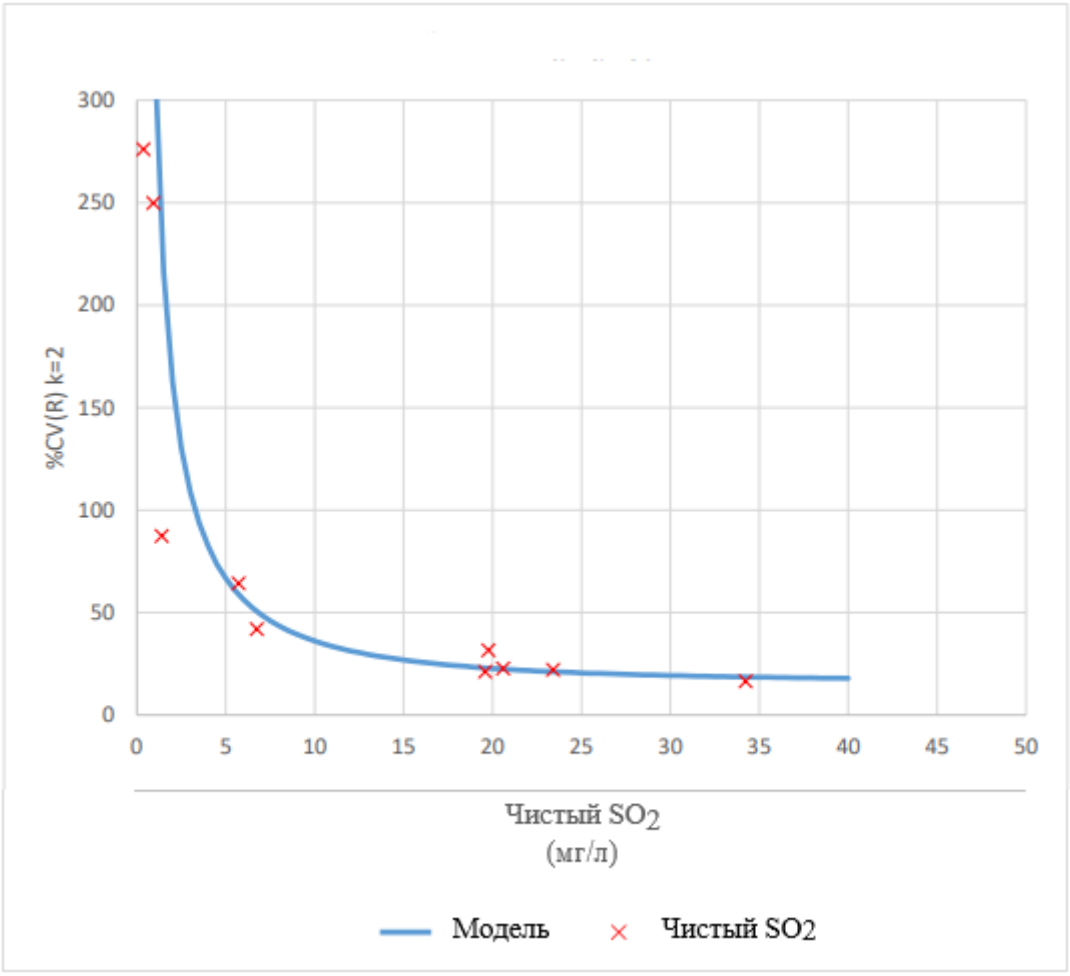


Рисунок 2: Моделирование коэффициента вариации для межлабораторной воспроизводимости, %CV(R) (k=2), в зависимости от концентрации, C:

$$\%CV(R) = \sqrt{\frac{323{,}6^2}{C^2} + 16^2}$$

5. Суммарный диоксид серы

5.1. Данные по суммарному содержанию SO2

Суммарный SO2	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Образец	1	14	2	16	3	19	4	12	5	20	6	18	7	11	8	15	9	17	10	13
Лаб 3			128	127	72	73	128	131	61	59	28	28	57	56	102	102	47	45		
Лаб 5			122	121	68	71	112	114	42	53	22	22	51	42	102	101	35	34		
Лаб 6		1	128	131	72	72	126	131	53	54	22	20	42	49	98	99	31	34	3	1
Лаб 7	3	3	131	131	70	74	130	131	54	59	26	23	46	48	106	101	37	40	1	1
Лаб 8	2	1	125	127	72	72	129	128	58	57	22	23	46	45	97	99	42	39	1	1
Лаб 9			120	128	77	75	132	108	71	59	21	25	44	47	110	99	38	48		
Лаб 10	2	2	130	130	74	76	130	130	61	61	28	32	55	56	103	104	43	44	3	4
Лаб 11	4	3	119	125	71	74	118	118	39	40	18	21	45	41	89	94	26	38	2	2
Лаб 14	3	3	129	128	72	72	127	129	58	58	32	29	50	49	102	101	42	41	3	4
Лаб 15			134	136	76	78	134	136	60	58	39	27	52	61	110	106	51	50		
Лаб 17	3	3	134	132	82	76	136	133	59	50	24	23	46	44	107	105	35	38	0	0
Лаб 18	5	3	130	129	78	73	133	133	62	59	29	32	58	52	105	105	50	48	2	2
Лаб 20	1	1	128	131	72	74	130	130	58	56	26	28	48	45	98	93	41	43	0	0
Лаб 21		0	124	125	69	72	124	126	45	51	19	20	42	42	97	97	35	34	0	1

Результаты, оставленные незаполненными, считались не поддающимися количественному измерению (< предела количественной оценки).
Результат, исключенный тестом Кохрана при 5%
Результат, исключенный тестом Граббса при 5%

5.2 Результаты по суммарному SO_2

Суммарный SO_2 (мг/л)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Кол-во отобран. лабораторий	7	12	13	13	8	13	10	13	12	9
Количество повторений	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Мин.	1	121.5	69.5	113	53.5	19.5	42	91.5	32.5	0
Макс.	3.5	135	77	135	61	30.5	56.5	108	50.5	3.5
Среднее значение	2.4	128.8	73.0	128.0	58.3	24.7	47.6	100.9	40.8	1.5
Стандартное отклонение	0.93	3.63	2.20	6.24	2.42	4.04	4.89	4.61	5.80	1.35
Дисперсия повторяемости	0.14	1.46	3.27	2.35	1.44	3.04	2.30	3.96	2.21	0.17
Межлабор.станд. отклонение	0.93	3.63	2.20	6.24	2.42	4.04	4.89	4.61	5.80	1.35
Дисперсия воспроизводимости	0.94	13.93	6.49	40.11	6.57	17.84	25.03	23.28	34.72	1.90
Станд. откл. повторяемости	0.38	1.21	1.81	1.53	1.20	1.74	1.52	1.99	1.49	0.41
Предел r	1.1	3.4	5.1	4.3	3.4	4.9	4.2	5.6	4.2	1.1
Повторяемость %CV (k=2)	31	2	5	2	4	14	6	4	7	54
Станд. откл. воспроизводимости	0.97	3.73	2.55	6.33	2.56	4.22	5.00	4.82	5	1.38
Предел R	2.7	10.5	7.1	17.7	7.2	11.8	14.0	13.5	16.5	3.9
Воспроизводимость %CV (k=2)	**80**	**6**	**7**	**10**	**9**	**34**	**21**	**10**	**29**	**184**
Хорвица PRSDR (%)	14.00	7.70	8.39	7.71	8.68	9.87	8.95	7.99	9.16	15.05
Horwitz SR	0.34	9.92	6.13	9.86	5.06	2.44	4.26	8.06	3.73	0.23
Horwitz R	0.96	28.05	17.33	27.90	14.31	6.91	12.04	22.80	10.56	0.64
Коэффициент Horwitz	2.82	0.37	0.41	0.64	0.50	1.71	1.16	0.59	1.56	6.04

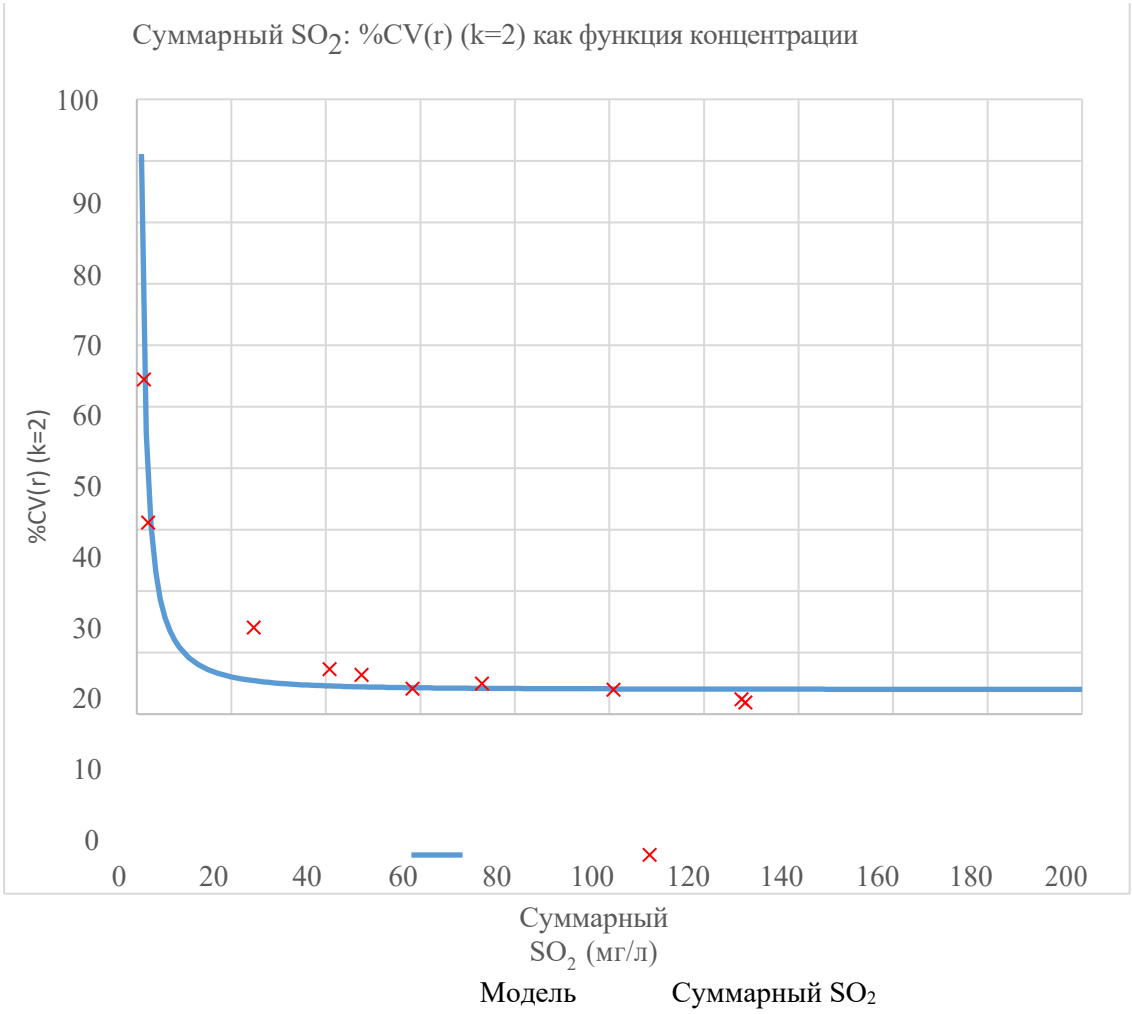


Рисунок 3: Моделирование коэффициента вариации повторяемости, %CV(r) (k=2), как функции концентрации, C:

$$\%CV(r) = \sqrt{\frac{91^2}{C^2} + 4^2}$$

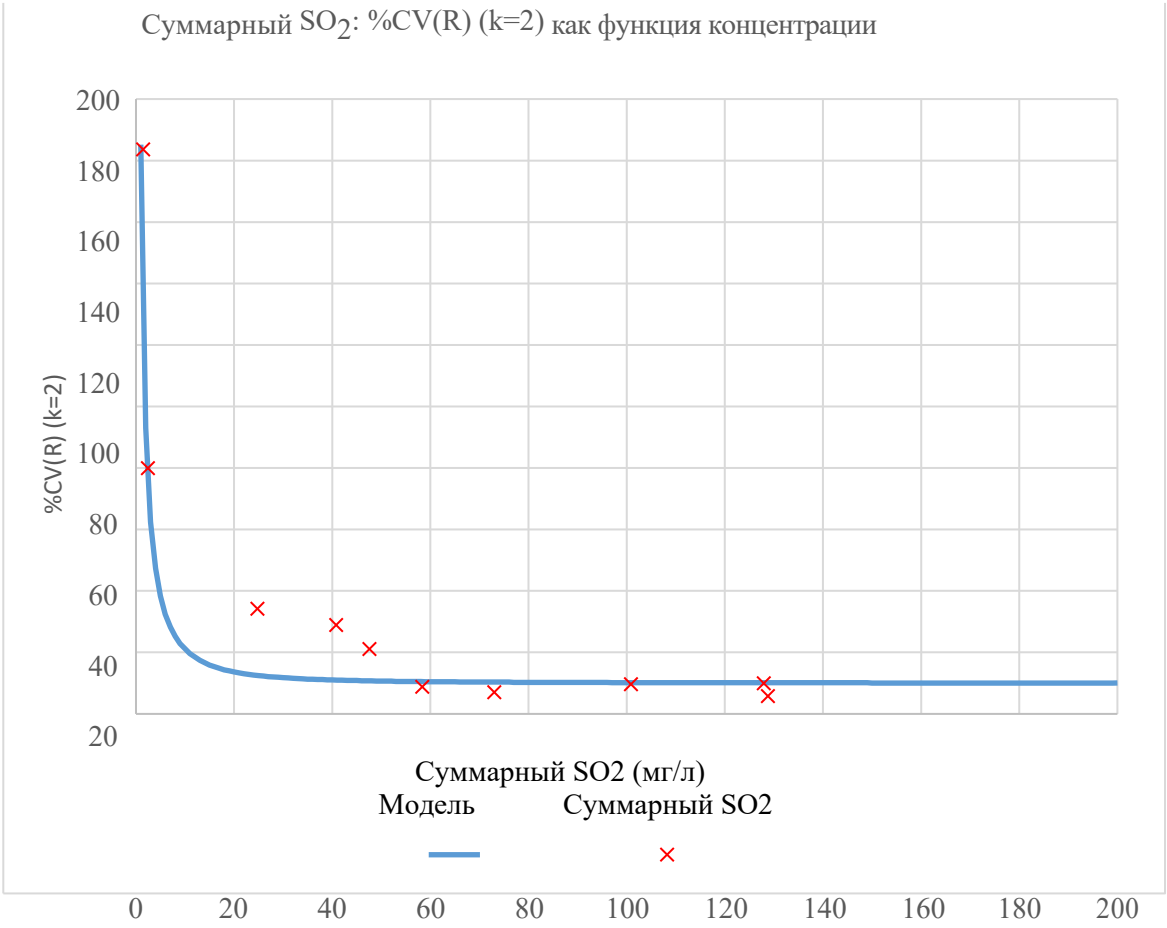


Рисунок 4: Моделирование коэффициента вариации межлабораторной воспроизводимости, %CV$_R$ (k=2), в зависимости от концентрации, C:

$$\%CV(R) = \sqrt{\frac{184{,}9^2}{C^2} + 10^2}$$

Метод OIV-MA-A323-04A2 Метод II типа

Суммарный диоксид серы
(Резолюция OIV-OENO 661-2021)

1 Область применения

Данный метод предназначен для определения суммарного диоксида серы в вине и сусле.

2 Определение

Суммарный диоксид серы определяется как сумма всех различных форм двуокиси серы, присутствующих в вине в свободной форме, или в связанной с составляющими вина форме.

3 Сущность метода

Диоксид серы увлекается потоком воздуха или азота, улавливается и окисляется при пропускании через разбавленный и нейтральный раствор перекиси водорода. Образовавшуюся серную кислоту определяют титрованием стандартным раствором гидроксида натрия.
Суммарный диоксид серы извлекается из вина путем удаления жидкости при высокой температуре (около 100 °C).

4 Реактивы и продукты

4.1 Чистая фосфорная кислота 85% (ρ20 = 1.71 г/мл) (CAS no. 7664-38-2)

4.2 Индикаторный реагент:

Метиловый красный (CAS no. 493-52-7)	100 мг (±1 мг)
Метиленовый синий (CAS no. 7220-79-3)	50 мг (±0.5 мг)
(Этанол (≥ 95%) (CAS no. 64-17-5)	50 мл

Доводят до объема 100 мл водой аналитического качества. Соблюдают пропорции для объемов, отличных от 100 мл.

Можно использовать коммерческие индикаторные реагенты того же состава.

4.3 1 M гидроксида натрия (3.84%) или в безводной форме (гранулы) (CAS no. 1310-73-2)

4.4 0.01 M раствора гидроксида натрия:

Пример: Разбавляют 10.0 мл 1 M гидроксида натрия (4.4) в 1 л воды аналитического качества.

При необходимости регулярно проверяют титр раствора (применяют поправочный коэффициент) и держат его подальше от атмосферного CO2.

4.5 Раствор перекиси водорода в 3 объемах (= 9,1 г/л = 0,27 моль/л H_2O_2), приготовленный или приобретенный через торговую сеть (например, 30% H_2O_2: смесь по CAS №7722-84-1)

Примечание: Раствор 30% по массе соответствует титру 110 объемов (ρ_{2o} = 1,11 г/мл) и означает объем кислорода, идеально выделяемого на литр H_2O_2 при стандартных условиях температуры и давления, в то время как раствор 3% по массе (ρ_{2o} = 1 г/мл) соответствует титру 10 объемов (0,89 моль/л). Таким образом, подготовка зависит от используемого коммерческого раствора и учитывает факт, что используемый в методе объем, в любом случае, будет избыточным.

5 Оборудование

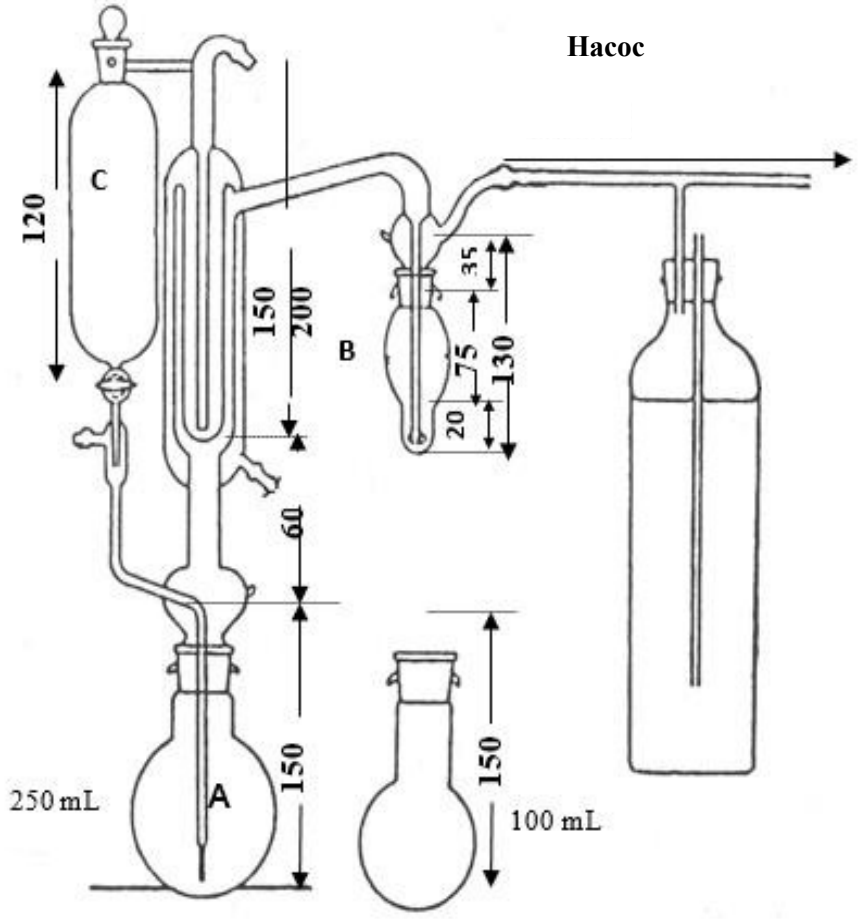
Используемый аппарат должен соответствовать приведенной ниже схеме, особенно что касается конденсатора.

Трубка подачи газа к барботеру **B** заканчивается маленькой сферой диаметром 1 см с 20 отверстиями диаметром в 0,2 мм, расположенными горизонтально вокруг большой окружности. В качестве альтернативы трубка может заканчиваться пластиной из стеклокерамики, в которой образуется большое количество мелких пузырьков и обеспечивается хороший переход от жидкой к газообразной фазе.

Скорость потока газа через аппарат должна составлять примерно 40 л/ч. Бутылка, расположенная справа от аппарата, предназначена для ограничения снижения давления, создаваемого водяным насосом, до 20-30 см вод. ст. Чтобы регулировать снижение давления при надлежащем расходе, предпочтительно установить расходомер с полукапиллярной трубкой между барботером и бутылкой. Для определения общего диоксида серы предпочтительнее использовать горелку (с высотой пламени 4-5 см или инфракрасную), позволяющую очень быстро достичь температуры кипения. Под колбу **A** следует помещать не проволочную сетку, а дефлектор с отверстием 2-4 см. Это предотвращает пирогенизацию нелетучих веществ на стенках колбы, содержащихся в вине.

Используют колбу на 250 мл для пробы объемом 50 мл и колбу на 100-150 мл для пробы объемом 20 мл.

Рисунок 1 - Размеры указаны в миллиметрах. Внутренние диаметры 4-х концентрических трубок конденсатора составляют 45, 34, 27 и 10 мм.



6 Выполнение исследования

Перед каждым новым определением рекомендуется промывать аппарат воздухом или азотом (например, в течение 5 минут). Если проводится холостой тест, цвет индикатора в нейтрализованном растворе перекиси водорода не должен измениться на выходе из газоподводящей трубки.

- Подключают воду из конденсатора.
- В барботер для забора **B** аппарата вводят 2-3 мл раствора перекиси водорода (4.5) и 2 капли индикаторного реактива (4.2), нейтрализуют с помощью 0,01 М раствора гидроксида натрия (4.4); нейтральный pH = зеленый цвет.
  Примечание: Для серии больших образцов можно подготовить уже нейтрализованный раствор H_2O_2 перед внесением его в колбу. Изменяют концентрацию и объем, учитывая то, что окислительная способность раствора должна сохраняться (уменьшенный срок хранения).
- Подсоединяют барботер к аппарату.
- Переносят 50 мл образца в колбу **A**, если предполагаемое общее содержание SO_2 < 50 мг/л, или 20 мл образца, если предполагаемое общее содержание SO_2 составляет ≥ 50 мг/л, присоединяют к аппарату.
- Вносят 15 мл фосфорной кислоты (4.1) в колбу C, если предполагаемое общее содержание SO_2 в пробе < 50 мг/л, и 5 мл фосфорной кислоты (4.1), если предполагаемое общее содержание SO_2 в пробе ≥ 50 мг/л.
- Открывают кран, чтобы добавить кислоту в пробу, одновременно запустив поток газа и установив таймер на 15 минут. Поддерживают температуру кипения в течение всего времени подачи газа. Увлеченный чистый диоксид серы окисляется в серную кислоту.
- Через 15 минут вынимают барботер **B** и промывают трубку подачи газа в воде (через воронку).
- Титруют кислоту, образованную 0,01 М раствором гидроксида натрия (4.5) до достижения зеленого цвета.
- Количество миллилитров выражается через *n*.

7 Расчеты и выражение результатов

Чистый диоксид серы выражается в миллиграммах на литр (мг/л), в целых числах.

Расчеты:

- Образцы с низким содержанием диоксида серы (отбор проб по 50 мл): 6.4 *n*
- Другие образцы (отбор проб по 20 мл): 16 *n*

8 Прецизионность

8.1 Повторяемость (r)
Содержание < 50 мг/л (отбор пробы 50 мл), r = 1 мг/л
Содержание ≥ 50 мг/л (отбор пробы 20 мл), r = 6 мг/л

8.2 Воспроизводимость (R)
Содержание < 50 мг/л (отбор пробы 50 мл), R = 9 мг/л
Содержание ≥ 50 мг/л (отбор пробы 20 мл), R = 15 мг/л

9 Библиография

Paul, F., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein,* 1958, ser. A, 821.

Совместное исследование

1. Область применения

Международное совместное исследование в соответствии с резолюцией OIV-OENO 6-2000 по валидации обновленных методов определения своодного диоксида серы и суммарного диоксида серы (OIV- MA-AS323-04A), решение подкомиссии МОВВ «Методы и анализы», апрель 2018 г.

2. Нормативные ссылки

- Обновление (проект) по методам OIV-MA-AS323-04A,
- ИСО 5725,
- Резолюция OIV-OENO 6-2000.

3. Протокол

Всего было подготовлено 20 образцов с использованием однородных объемов 10 вин из различных винных регионов Франции и Португалии. Каждый образец проверялся дважды (второй - как слепой дубликат) в соответствии с принципом двойного слепого анализа. Образцы были приготовлены в период с 18 по 20 июня 2018 года и отправлены без задержек лабораториям-участникам.

№ образца	№ слепого дублирования	Тип образца
A	1-14	Сухое белое вино
B	2-16	Сухое белое вино
C	3-19	Сухое розовое вино
D	4-12	Сухое розовое вино
E	5-20	Сухое красное вино
F	6-18	Сухое красное вино
G	7-11	Сухое красное вино
H	8-15	Белое ликерное вино
I	9-17	Красное ликерное вино
J	10-13	Красное ликерное вино

Анализы проводились всеми участвующими лабораториями одновременно, в период с 16 по 20 июля 2018 года.
Образцы хранились в холодильных шкафах всеми лабораториями с даты получения до даты анализа, согласно отправленным протоколам

Свои результаты предоставили следующие лаборатории:

Лаборатория	**Город**	**Страна**
Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	Лейро (Оуренсе)	Испания
Laboratorio arbitral agroalimentario	Мадрид	Испания
ASAE	Лиссабон	Португалия
SCL Montpellier	Монпелье Седекс 5	Франция
HBLA und BA für Wein- und Obstbau	Клостернойбург	Австрия
Laboratorio de Salud Pública	Мадрид	Испания
Laboratorio Agroambiental de Zaragoza	Сарагоса	Испания
Laboratoire SCL Bordeaux	Пессак Седекс - CS 98080	Франция
Unione Italiana Vini Servizi	Верона	Италия
Laboratorio Agroalimentario de Valencia	Бурхассот (Валенсия)	Испания
Agroscope	Ньон	Швейцария
Laboratoires Dubernet	Монтредон-де-Корбьер	Франция
Laboratoire Dioenos Rhône	Орандж	Франция
Laboratoire Natoli	Сен-Клеман де Ривьер	Франция

Примечание: с целью сохранения анонимности результатов порядок лабораторий в таблице не соответствует порядку в последующих таблицах.

4. Чистый диоксид серы

4.1 Данные по чистому SO2

Чистый SO2	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Образец	**1**	**14**	**2**	**16**	**3**	**19**	**4**	**12**	**5**	**20**	**6**	**18**	**7**	**11**	**8**	**15**	**9**	**17**	**10**	**13**
Лаб 3			31	36	18	18	21	23	20	18	6	6	20	17	5	6				
Лаб 5			37	35	21	24	24	25	20	20	8	7	20	20	3	4				
Лаб 6	4	1	38	33	21	20	20	26	19	20	7	6	21	19	7	8	1	3	1	1
Лаб 7	1	1	37	40	20	22	24	26	20	22	9	8	20	23	8	8	2	1	1	1
Лаб 8			31	32	18	19	23	22	22	20	6	7	19	20	5	3	1	1		
Лаб 9			35	34	23	19	25	24	21	24			17	17						
Лаб 10	2	1	35	34	20	21	24	24	22	21	9	8	21	20	7	7	2	2	1	1
Лаб 11	0	0	33	30	17	11	22	16	16	21	6	4	15	19	6	3	1	1	0	0
Лаб 15			15	19	15	13	18	20	8	16	6	5	8	15	5	5				
Лаб 17	0	0	37	38	24	26	28	28	26	23	8	8	24	22	7	7	1	2	0	0
Лаб 18	0	4	33	31	21	11	23	27	15	19	6	4	9	20	3	4	1	1	0	0
Лаб 20	0	0	32	32	20	19	21	21	29	21	8	8	20	18	12	4	1	1	0	0
Лаб 21	2	1	33	38	19	15	25	22	19	21	6	6	19	20	8	7	2	1	0	0

Результаты, оставленные незаполненными, считались не поддающимися количественному измерению (< предела количественной оценки).
Результат, исключенный тестом КОХРАНА при 5%
Результат, исключенный тестом ГРАББСА при 5%

4.2 Результаты по чистому SO_2

Чистый SO2 (мг/л)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Кол-во отобран. лабораторий	7	9	11	10	10	12	11	11	9	8
Количество повторений	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Мин.	0	31.5	14	19	17	5	17	3.5	1	0
Макс.	2.5	38.5	25	28	24.5	8.5	23	8	2	1
Среднее значение	0.9	34.2	19.8	23.4	20.6	6.8	19.6	5.7	1.4	0.4
Стандартное отклонение	0.98	2.67	2.91	2.46	2.04	1.31	1.77	1.72	0.42	0.52
Дисперсия повторяемости	0.79	1.67	2.59	1.20	2.60	0.58	2.23	0.82	0.39	0.00
Межлабор.станд. отклонение	0.98	2.67	2.91	2.46	2.04	1.31	1.77	1.72	0.42	0.52
Дисперсия воспроизводимости	1.35	7.97	9.76	6.64	5.46	2.00	4.25	3.38	0.37	0.27
Станд. отклон. повторяемости	0.89	1.29	1.61	1.10	1.61	0.76	1.49	0.90	0.62	0.00
Предел r	2.48	3.61	4.51	3.07	4.51	2.14	4.18	2.53	1.75	0.00
Повторяемость %CV (k=2)	191	8	16	9	16	23	15	32	90	0
Станд. откл. воспроизводимости	1.16	2.82	3.12	2.58	2.34	1.41	2.06	1.84	0.61	0.52
Предел R	3.25	7.90	8.75	7.22	6.54	3.96	5.78	5.15	1.70	1.45
Воспроизводимость %CV (k=2)	**250**	**16**	**32**	**22**	**23**	**42**	**21**	**64**	**87**	**276**
Horwitz PRSDR (%)	16.18	9.40	10.21	9.95	10.15	12.00	10.22	12.30	15.23	18.55
Horwitz sR	0.15	3.22	2.02	2.33	2.09	0.81	2.00	0.70	0.21	0.07
Horwitz R	0.42	9.10	5.71	6.59	5.91	2.29	5.67	1.99	0.60	0.20
Коэффициент Horwitz	7.64	0.87	1.53	1.10	1.11	1.73	1.02	2.58	2.84	7.37

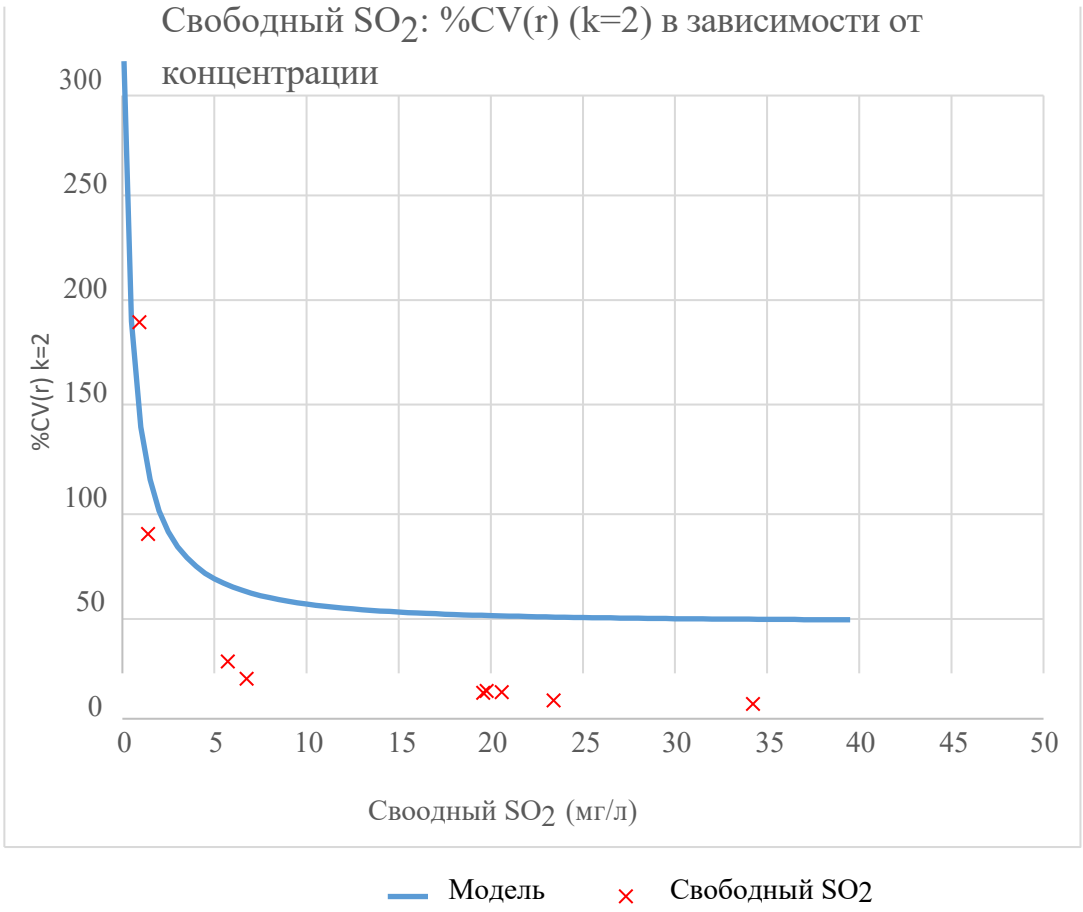


Рисунок 1: Моделирование коэффициента вариации повторяемости, %CV(r) (k=2), в зависимости от концентрации, C:

$$\%CV(r) = \sqrt{\frac{164{,}55^2}{C^2} + 9^2}$$

Свободный SO2: %CV(R) (k=2) в зависимости от концентрации

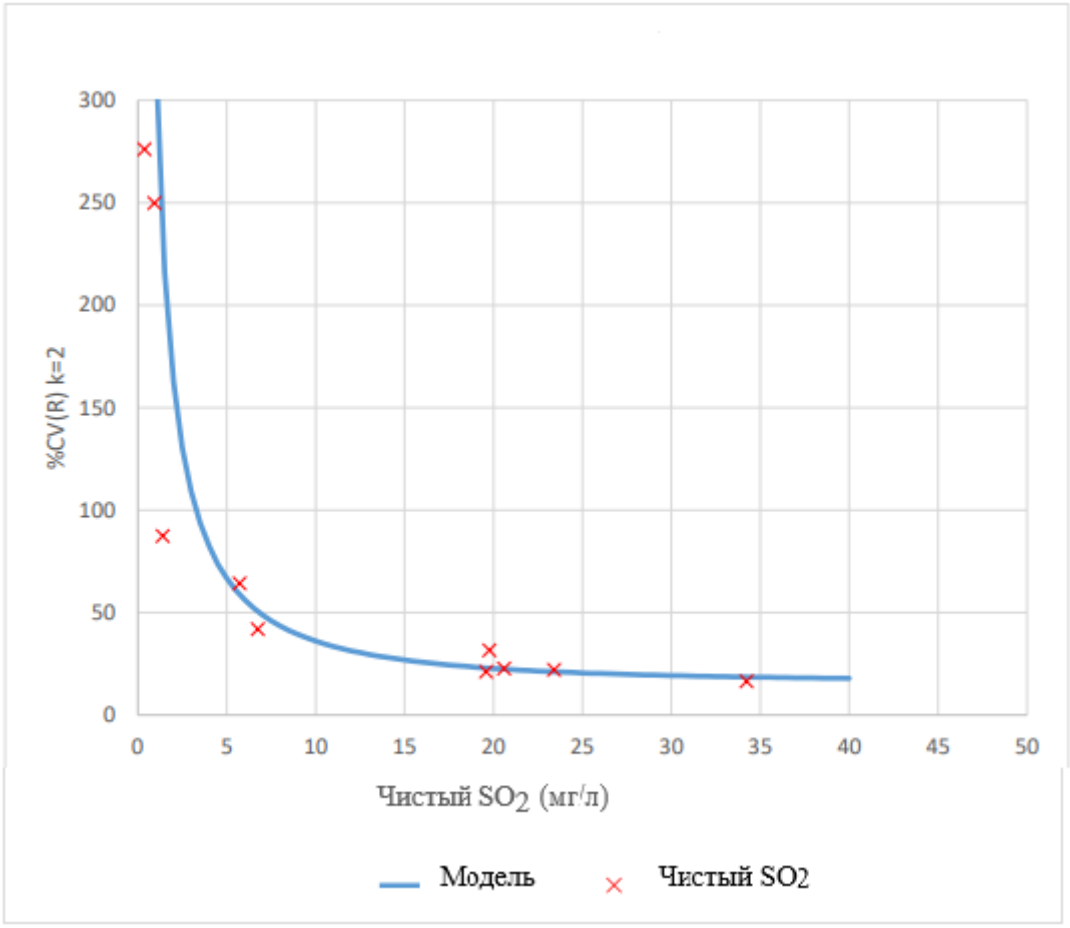


Рисунок 2: Моделирование коэффициента вариации межлабораторной воспроизводимости, %CV(R) (k=2), в зависимости от концентрации, C:

$$\%CV(r) = \sqrt{\frac{323{,}6^2}{C^2} + 16^2}$$

5. Суммарный диоксид серы

5.1. Данные по суммарному SO_2

Суммарный SO_2	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Образец	**1**	**14**	**2**	**16**	**3**	**19**	**4**	**12**	**5**	**20**	**6**	**18**	**7**	**11**	**8**	**15**	**9**	**17**	**10**	**13**
Лаб 3			128	127	72	73	128	131	61	59	28	28	57	56	102	102	47	45		
Лаб 5			122	121	68	71	112	114	42	53	22	22	51	42	102	101	35	34		
Лаб 6		1	128	131	72	72	126	131	53	54	22	20	42	49	98	99	31	34	3	1
Лаб 7	3	3	131	131	70	74	130	131	54	59	26	23	46	48	106	101	37	40	1	1
Лаб 8	2	1	125	127	72	72	129	128	58	57	22	23	46	45	97	99	42	39	1	1
Лаб 9			120	128	77	75	132	108	71	59	21	25	44	47	110	99	38	48		
Лаб 10	2	2	130	130	74	76	130	130	61	61	28	32	55	56	103	104	43	44	3	4
Лаб 11	4	3	119	125	71	74	118	118	39	40	18	21	45	41	89	94	26	38	2	2
Лаб 14	3	3	129	128	72	72	127	129	58	58	32	29	50	49	102	101	42	41	3	4
Лаб 15			134	136	76	78	134	136	60	58	39	27	52	61	110	106	51	50		
Лаб 17	3	3	134	132	82	76	136	133	59	50	24	23	46	44	107	105	35	38	0	0
Лаб 18	5	3	130	129	78	73	133	133	62	59	29	32	58	52	105	105	50	48	2	2
Лаб 20	1	1	128	131	72	74	130	130	58	56	26	28	48	45	98	93	41	43	0	0
Лаб 21		0	124	125	69	72	124	126	45	51	19	20	42	42	97	97	35	34	0	1

Результаты, оставленные незаполненными, считались не поддающимися количественному измерению (< предела количественной оценки).
Результат, исключенный тестом КОХРАНА при 5%
Результат, исключенный тестом ГРАББСА при 5%

5.2 Результаты по суммарному SO_2

Суммарный SO_2 (мг/л)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Кол-во отобран. лабораторий	7	12	13	13	8	13	10	13	12	9
Количество повторений	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Мин.	1	121.5	69.5	113	53.5	19.5	42	91.5	32.5	0
Макс.	3.5	135	77	135	61	30.5	56.5	108	50.5	3.5
Среднее значение	2.4	128.8	73.0	128.0	58.3	24.7	47.6	100.9	40.8	1.5
Стандартное отклонение	0.93	3.63	2.20	6.24	2.42	4.04	4.89	4.61	5.80	1.35
Дисперсия повторяемости	0.14	1.46	3.27	2.35	1.44	3.04	2.30	3.96	2.21	0.17
Межлабор.станд. отклонение	0.93	3.63	2.20	6.24	2.42	4.04	4.89	4.61	5.80	1.35
Дисперсия воспроизводимости	0.94	13.93	6.49	40.11	6.57	17.84	25.03	23.28	34.72	1.90
Стандартн. откл. повторяемости	0.38	1.21	1.81	1.53	1.20	1.74	1.52	1.99	1.49	0.41
Предел r	1.1	3.4	5.1	4.3	3.4	4.9	4.2	5.6	4.2	1.1
Повторяемость %CV (k=2)	31	2	5	2	4	14	6	4	7	54
Станд. откл. воспроизводимости	0.97	3.73	2.55	6.33	2.56	4.22	5.00	4.82	5.89	1.38
R предел	2.7	10.5	7.1	17.7	7.2	11.8	14.0	13.5	16.5	3.9
Воспроизводимость %CV (k=2)	**80**	**6**	**7**	**10**	**9**	**34**	**21**	**10**	**29**	**184**
Horwitz $PRSD_R$ (%)	14.00	7.70	8.39	7.71	8.68	9.87	8.95	7.99	9.16	15.05
Horwitz SR	0.34	9.92	6.13	9.86	5.06	2.44	4.26	8.06	3.73	0.23
Хорвица R	0.96	28.05	17.33	27.90	14.31	6.91	12.04	22.80	10.56	0.64
Коэффициент Horwitz	2.82	0.37	0.41	0.64	0.50	1.71	1.16	0.59	1.56	6.04

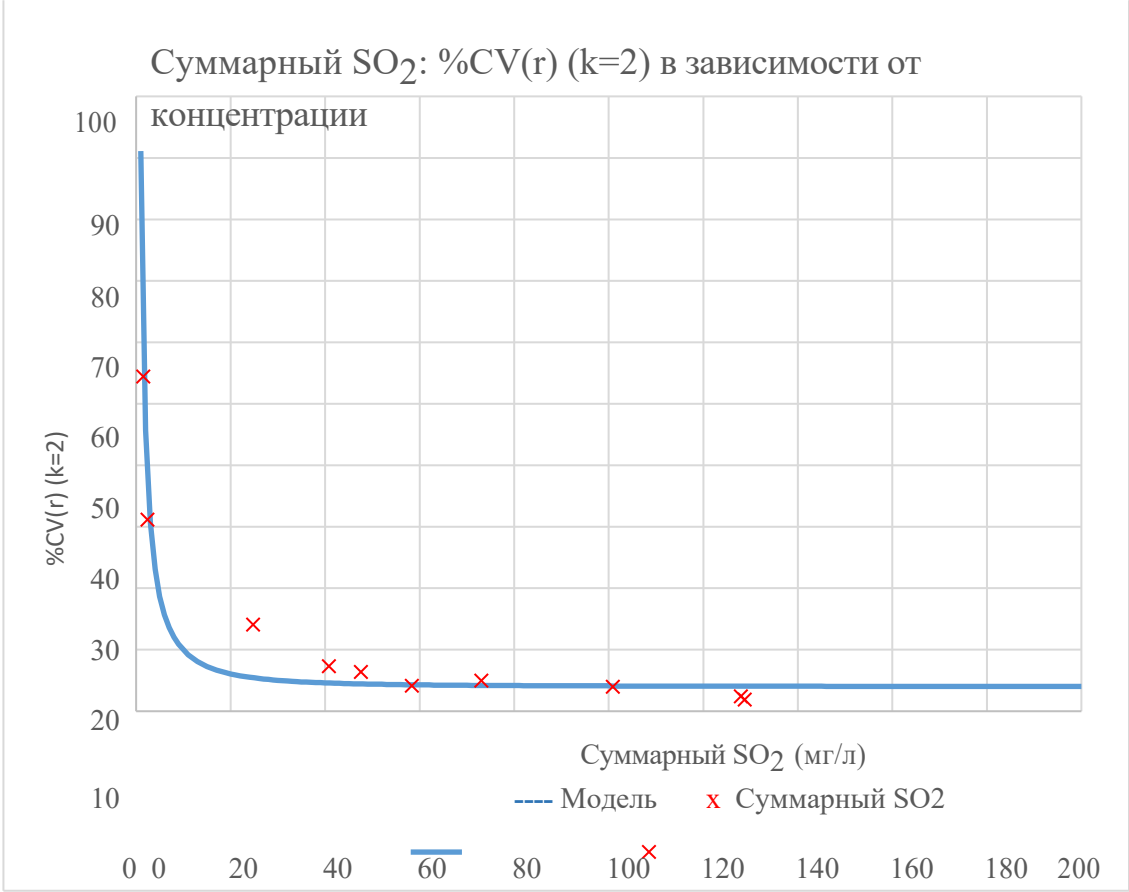


Рисунок 3: Моделирование коэффициента вариации для повторяемости, %CV(r) (k=2), в зависимости от концентрации, C:

$$\%CV(r) = \sqrt{\frac{91^2}{C^2} + 4^2}$$

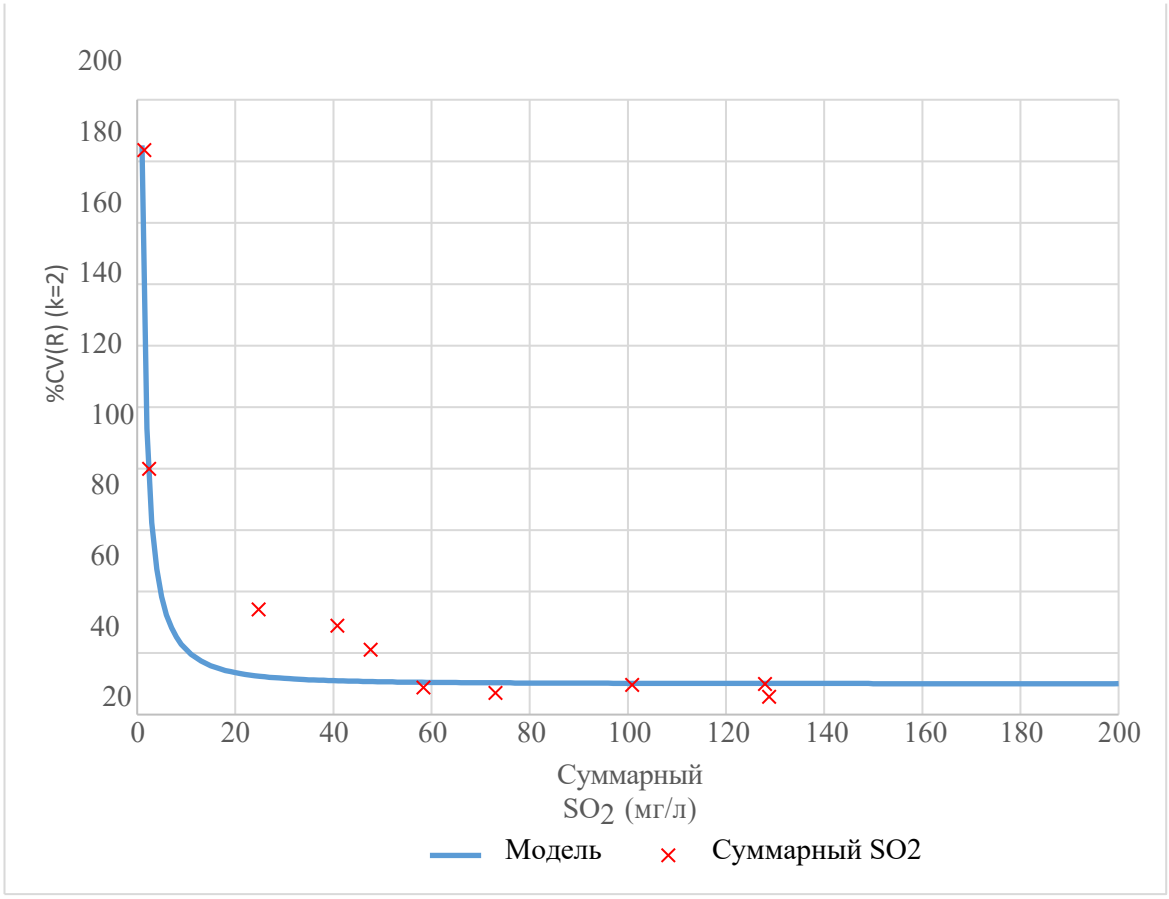


Рисунок 4: Моделирование, коэффициента вариации межлабораторной воспроизводимости $\%CV_R$ (k=2), в зависимости от концентрации, C:

$$\%CV(R) = \sqrt{\frac{184{,}9^2}{C^2} + 10^2}$$

Метод OIV-MA-AS323-04B Метод IV-го типа

Диоксид серы
(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Определение

Чистый диоксид серы или двуокись серы присутствует в сусле или вине в следующих формах: H_2SO_3, HSO_3, равновесие которых зависит от pH и температуры:

H^+ +

HSO_3

H_2SO_3 представляет собой молекулярный диоксид серы.

Суммарный диоксид серы определяется как совокупность всех различных форм диоксида серы, присутствующих в вине, либо в чистом состоянии, либо в сочетании с их составляющими.

2. Своодный и суммарный диоксид серы

2.1 *Принцип работы*

Свободный диоксид серы определяется прямым титрованием йодом. Комбинированный диоксид серы впоследствии определяется йодометрическим титрованием после щелочного гидролиза. При добавлении к чистому диоксиду серы он создает суммарный диоксид серы.

2.2 *Быстрый метод*

2.2.1 *Реактивы*

2.2.1.1 EDTA: этилендиаминтетрауксусная кислота, *динатриевая* соль

2.2.1.2 4 M раствора гидроксида натрия (160 г/л).

2.2.1.3 Разбавленная серная кислота: 10% серной кислоты (ρ_{20} = 1,84 г/мл), разбавленная 10% (об/об).

2.2.1.4 Раствор крахмала, 5 г/л.

Смешивают 5 г крахмала с примерно 500 мл воды. Доводят до кипения и постоянно помешивая, продолжают кипятить еще в течение 10 минут. Добавляют 200 г хлорида натрия. Охлаждают и доводят до 1 л.

2.2.1.5 0.025 M раствора йода

2.2.2 *Чистый диоксид серы*

Помещают в коническую колбу емкостью 500 мл:

- 50 мл вина
- 5 мл раствора крахмала
- 30 мг EDTA
- 3 мл H_2SO_4

Без промедления титруют 0,025 M йодом, пока синий цвет не будет четко сохраняться в течение 10 - 15 секунд. Пусть *n* мл - это объем использованного йода.

2.2.3 *Комбинированный диоксид серы*

Добавляют 8 мл 4 M раствора гидроксида натрия, встряхивают смесь один раз и дают постоять 5 минут. При энергичном перемешивании в один прием добавляют содержимое маленькой мензурки, в которую помещено 10 мл серной кислоты. Без промедления титруют 0,025 M раствора йода; пусть *n′* будет использованным объемом.

Добавляют 20 мл раствора гидроксида натрия, встряхивают один раз и дают постоять в течение 5 минут. Разбавляют до 200 мл ледяной водой.

Добавляют при энергичном перемешивании за один прием содержимое пробирки, в которую предварительно поместили 30 мл серной кислоты. Сразу же титруют свободный диоксид серы 0,025 M йодом, пусть *n″* - объем использованного йода.

2.2.4 *Выражение результатов*

2.2.4.1 Расчеты

Свободный диоксид серы в миллиграммах на литр определяется выражением:

$$32 \cdot n$$

Общее количество диоксида серы в миллиграммах на литр определяется:

$$32\ (n + n' + n'')$$

Примечания:

1. Для красных вин с низкой концентрацией SO_2 можно разбавить 0,025 M йода (например, 0,01 M). В этом случае заменяют коэффициент 32 на 12,8 в приеденной выше формуле.
2. Красные вина полезно подсвечивать снизу лучом желтого света от обыкновенной электрической лампочки, проходящего через раствор хромата калия или от натриевой паровой лампы. Определение следует проводить в темной комнате и следить за прозрачностью вина: оно

становится непрозрачным при достижении конечной точки содержания крахмала.

3. Если количество обнаруженного диоксида серы близко или превышает установленный законом предел, суммарный диоксид серы следует определять эталонным методом.
4. Если требуется определение чистого диоксида серы, проводят определение на образце, хранящемся в анаэробных условиях в течение двух дней при 20 °C до начала анализа. Проводят определение при 20 °C.

5. Поскольку некоторые вещества окисляются йодом в кислой среде, необходимо более точно определить количество йода, используемого таким способом. Для этого соединяют чистый диоксид серы с избытком этаналя или пропаналя перед началом титрования йодом. Помещают 50 мл вина в коническую колбу емкостью 300 мл, добавляют 5 мл раствора этанола 7 г/л или 5 мл раствора пропаналя 10 г/л.

Закупоривают колбу и дают постоять не менее 30 минут. Добавляют 3 мл серной кислоты и достаточное количество 0,025 M йода, чтобы крахмал изменил цвет. Пусть n''' мл - это объем использованного йода. Его необходимо вычесть из n (чистый диоксид серы) и из $n + n' + n''$ (суммарный диоксид серы).

Обычно значение n'''' невелико, от 0,2 до 0,3 мл 0,025 M йода. Если в вино была добавлена аскорбиновая кислота, n''' будет гораздо больше. По значению n'''' можно приблизительно определить количество данного вещества, с учетом того, что 1 мл 0,025 M йода окисляет 4,4 мг аскорбиновой кислоты. Определяя n''' можно довольно легко обнаружить присутствие остаточной аскорбиновой кислоты в количестве более 20 мг/л в винах, в которые она была добавлена.

БИБЛИОГРАФИЯ

Быстрый метод:

RIPPER M., *J. Prakt. Chem.,* 1892, **46,** 428.

JAULMES, P., DIEUZEIDE J.-C., *Ann. Fals. Fraudes,* 1954, **46,** 9; *Bull. O.I.V.,* 1953, **26,** n° 274, 52.

KIELHOFER E., AUMANN H., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein,* 1957, **7,** 289.

JAULMES P., HAMELLE M^{me} G., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1961, **54,** 338

Метод OIV-MA-AS323-04C Метод IV-го типа

Диоксид серы
(Резолюция Oeno 377/2009)

1. Определение

Свободный диоксид серы или двуокись серы присутствует в сусле или вине в следующих формах: H_2SO_3, HSO_3, равновесие которых зависит от pH и температуры:

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3$$

H_2SO_3 представляет собой молекулярный диоксид серы.

Суммарный диоксид серы определяется как совокупность всех различных форм диоксида серы, присутствующих в вине, либо в чистом состоянии, либо в сочетании с их составляющими.

2 Молекулярный диоксид серы

2.1 *Сущность метода*

Процентное содержание молекулярного диоксида серы, H_2SO_3, в свободном диоксиде серы рассчитывается в зависимости от pH, крепости спирта и температуры.
Для данной температуры и крепости спирта:

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3$$

(1)

$$[H_2SO_3] = \frac{L}{10^{(pH - pk_M)} + 1}$$

где

$$L = [H_2SO_3] + [HSO_3^-]$$

$$pk_M = pk_T - \frac{A\sqrt{I}}{I + B\sqrt{I}}$$

I = ионная сила

A и B =, изменяемые в зависимости от температуры и крепости спирта коэффициенты

k_T = термодинамическая константа диссоциации; значение pk_T приведено в таблице 1 для различной крепости спирта и температур

k_M = константа смешанной диссоциации

Принимая среднее значение за 0,038 для ионной силы I, в таблице 2 приведены значения pk_M для различных температур и крепости спирта.

Молекулярное содержание диоксида серы, рассчитанное по зависимости (1), представлено в таблице 3 для различных значений pH, температуры и крепости спирта.

2.2 Расчеты

При определенном значении pH вина и его алкогольной крепости из таблицы 3 определяем процент молекулярного диоксида серы для определенной температуры t °C. Пусть это будет X %.

Количество молекулярного диоксида серы в мг/л определяется из следующего выражения: X · C, где C = свободный диоксид серы в мг/л.

Таблица I

Значения термодинамической константы pk_T

Алкоголь по объему %	Температура °C				
	20	25	30	35	40
0	1.798	2.000	2.219	2.334	2.493
5	1.897	2.098	2.299	2.397	2.527
10	1.997	2.198	2.394	2.488	2.606
15	2.099	2.301	2.503	2.607	2.728
20	2.203	2.406	2.628	2.754	2.895

Таблица II

Значения смешанной константы диссоциации pk_M (I= 0.038)

Алкоголь по объему	Температура °C				
	20	25	30	35	40
0	1.723	1.925	2.143	2.257	2.416
5	1.819	2.020	2.220	2.317	2.446
10	1.916	2.116	2.311	2.405	2.522
15	2.014	2.216	2.417	2.520	2.640
20	2.114	2.317	2.538	2.663	2.803

Таблица III

Процентное соотношение молекулярного диоксида серы от чистого диоксида серы (I=0.038)

pH	T = 20 °C Алкоголь по объему в %				
		0	10	15	20
2.8	7.73	9.46	11.5	14.0	17.0
2.9	6.24	7.66	5	7	9
3.0	5.02	6.18	9.40	11.5	14.0
3.1	4.03	4.98	7.61	1	7
3.2	3.22	3.99	6.14	9.36	11.5
3.3	2.58	3.20	4.94	7.58	1
3.4	2.06	2.56	3.98	6.12	9.36
3.5	1.64	2.04	3.18	4.92	7.58
3.6	1.31	1.63	2.54	3.95	6.12
3.7	1.04	1.30	2.03	3.16	4.92
T = 25					

2.8	11.4	14.2	17.1	20.6	24.7
2.9	7	3	5	7	5
3.0	9.58	11.6	14.1	17.1	22.7
3.1	7.76	5	2	5	1
3.2	6.27	9.48	11.5	14.1	17.1
3.3	5.04	7.68	5	2	8
3.4	4.05	6.20	9.40	11.5	14.1
3.5	3.24	4.99	7.61	5	5
3.6	2.60	4.00	6.14	9.40	11.5
3.7	2.07	3.20	4.94	7.61	8
T = 30					
2.8	18.0	20.8	24.4	29.2	35.3
2.9	5	3	9	8	6
3.0	14.8	17.2	20.4	24.7	30.2
3.1	9	8	8	5	9
3.2	12.2	14.2	16.9	20.7	25.6
3.3	0	3	8	1	6
3.4	9.94	11.6	13.9	17.1	21.5
3.5	8.06	5	8	8	2
3.6	6.51	9.48	11.4	14.1	17.8

Таблица III (продолжение)
Процентное соотношение молекулярного диоксида серы от чистого диоксида серы (I=0.038)

pH	T=35 °C Алкоголь по объему в %				
	0	5	10	15	20
2.8	22.2	24.7	28.7	34.4	42.1
2.9	7	5	1	2	8
3.0	18.5	20.7	24.2	29.4	36.6
3.1	3	1	4	2	9
3.2	15.3	17.1	20.2	24.8	31.5
3.3	1	8	6	8	2
3.4	12.5	14.1	16.7	20.8	26.7
3.5	5	5	9	3	7
3.6	10.2	11.5	13.	17.2	22.5
T = 40					
2.8	29.2	30.6	34.5	40.8	50.1
2.9	3	8	2	9	4
3.0	24.7	26.0	29.5	35.4	44.7
3.1	0	1	2	7	4
3.2	20.6	21.8	24.9	30.3	38.8
3.3	7	3	6	9	5
3.4	17.1	18.1	20.9	25.7	33.5
3.5	5	6	0	5	4
3.6	14.1	14.9	17.3	21.6	28.6

БИБЛИОГРАФИЯ

Молекулярный диоксид серы:

BEECH F.W. & TOMAS M^me S., *Bull. O.I.V.,* 1985, **58,** 564-581.
USSEGLIO-TOMASSET L. & BOSIA P.D., *F.V., O.I.V.,* 1984, n° 784.

Метод OIV-MA-AS323-06 Метод IV типа

Определение содержания ртути в вине методом генерации паров и атомной спектрофлуориметрии

(Резолюция Oeno 15/2002)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данный метод применяется для анализа ртути в винах с пределом концентрации от 0 до 10 мкг/л.

2. ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ

2.1. Сущность метода

2.1.1 Минерализация вина происходит в кислой среде:
нагревание под рефлюксом;
минерализация достигается с использованием перманганатакалия.

2.1.2 Восстановление неконцентрированного перманганата гидрохлоридом гидроксиламина.

2.1.3. Восстановление ртути II (металлической ртути хлористым оловом (II).

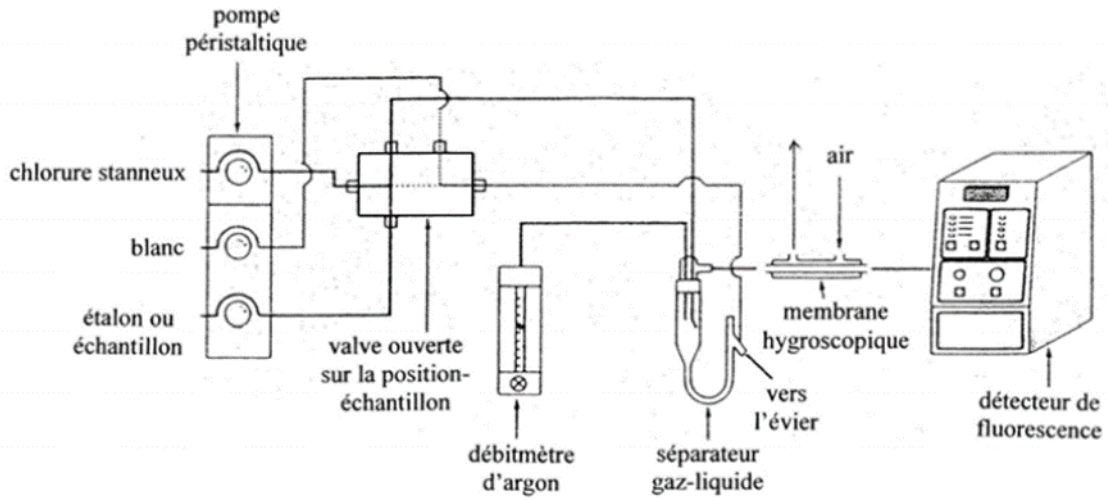
2.1.4. Захват ртути потоком аргона при комнатной температуре.

2.1.5. Дозировка ртути в моноатомном парообразном состоянии при помощи атомно-флуоресцентного спектрометра с длиной волны 254 нм. Атомы ртути возбуждаются ртутной паровой лампой; возбужденные таким образом атомы испускают излучение, называемое флуоресцентным, которое позволяет количественно определить присутствующую ртуть с помощью фотонного детектора, обеспечивающего хорошую линейность при устранении эффекта памяти.

2.2 Сущность анализа (рисунок 1)

Перистальтический насос всасывает раствор хлорида олова, кпустой раствор (деминерализованная вода, содержащая 1% азотной кислоты) и образец минерализованного вина.

Металлическая ртуть захватывается в газожидкостном сепараторе током аргона. После прохождения через осушительную трубку ртуть обнаруживается по флоуресценции. Далее газообразный поток проходит через раствор перманганата калия для улавливания ртути.



pompe péristaltique - перистальтический насос; chlorure stanneux - хлористое олово; blanc - холостой раствор; étalon / échantillon - эталон или проба; valve ouverte sur la position-échantillon - клапан открыт в позици проба; débitmètre d'argon - аргоновый расходомер; séparateur gaz-liquide - газожидкостный сепаратор; vers l'évier – к раковине;
air – воздух; membrane hydroscopique - гигроскопичная мембрана; détecteur de fluorescence - детектор флоресцентный

Рисунок 1. Аналитическая цепочка для определения ртути

3. РЕАКТИВЫ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВНЫХ РАСТВОРОВ

3.1 Сверхчистая деминерализованная вода

3.2 **Сверхчистая 65% азотная кислота**

3.3 **Холостой раствор: деминерализованная вода (3.1), содержащая 1% азотной кислоты (3.2)**

3.4 **Раствор азотной кислоты 5,6 М (3.1):**

Помещают 400 мл азотной кислоты (3.2) в колбу емкостью 1000 мл; дополняют деминерализованной водой (3.1).

3.5 Серная кислота (d= 1,84)

3.6 Раствор серной кислоты 9М:

Помещают 200 мл деминерализованной воды (3.1), 50 г перманганата калия (3.7) в колбу емкостью 1000 мл; дополняют деминерализованной водой (3.1).

3.7 Перманганат калия $KMnO_4$

3.8 5% раствор перманганата калия:

Растворяют 50 г перманганата калия (3.7) в деминерализованной воде (3.1) в колбе емкостью 1000 мл. Дополняют деминерализованной водой (3.1).

3.9 Гидроксиламин хлористоводородный NH_2OH, HCl

3.10 Восстанавливающий раствор:

Взвешивают 12 г хлористого водорода гидроксиламина (3.9) и растворяют в 100 мл деминерализованной воды (3.1).

3.11 Хлористое олово ($SnCl_2$, 2 H_2O)

3.12 Концентрированная соляная кислота

3.13 Раствор хлористого олова:

Взвешивают 40 г хлорида двухвалентного олова (3.11) и растворяют в 50 мл соляной кислоты (3.12). Заливают 200 мл деминерализованной воды (3.1).

3.14 Стандартный раствор ртути в концентрации 1 г/л

приготовленный путем растворения 1708 г Hg (NO3). H_2O в водном растворе азотной кислоты при 12%, приготовленном из металлической ртути.

3.15 Эталонный раствор ртути в концентрации 10 мг/л :

Помещают 1 мл стандартного раствора ртути (3.14) в 100 мл объемную колбу, добавляют 5 мл азотной кислоты, заливают деминерализованной водой (3.1)

3.16 Раствор ртути в концентрации 50 мг/л:

Помещают 1 мл раствора 10 мг/л (3.15) в колбу емкостью 200 мл. Добавляют 2 мл азотной кислоты (3.2). Заливают деминерализованной водой (3.1).

4. ОБОРУДОВАНИЕ

4.1 Стеклянная посуда

4.1.1 Объемные колбы 100, 200 и 1000 мл (класс А)

4.1.2 Градуированная пипетка 0.5, 1.0, 2.0, 5, 10 и 20 мл (класс А)

4.1.3 *Меры предосторожности: Перед использованием стеклянную посуду промывают 10% азотной кислотой, не смывают 24 часа, затем промывают деминерализованной водой.*

4.2 Минерализационное оборудование (рисунок 2)

4.3 Колбонагреватель с регулятором температуры

4.4 Перистальтический насос

4.5 Генератор холодного пара

4.5.1 Газожидкостный сепаратор

4.6 Десикант (гигроскопическая мембрана), обтекаемая потоком воздуха (подается от компрессора) и помещенная перед детектором

4.7 Спектрофлуориметр

4.7.1 Ртутно-паровая лампа, настроенная на длину волны 254 нм

4.7.2 Специфический детектор атомной флуоресценции

4.8 Компьютер

4.8.1 Программное обеспечение, которое регулирует параметры парогенератора и атомно-флуоресцентного детектора, обеспечивает калибровку и использование результатов.

4.8.2 Принтер, который сохраняет результаты

4.9 Баллон с нейтральным газом (аргон)

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КАЛЛИБРОВОЧНЫХ РАСТВОРОВ И ОБРАЗЦОВ

5.1 НАБОР КАЛИБРОВОЧНЫХ РАСТВОРОВ: 0; 0,25; 0,5; и 1,0 мкг/л

Вносят: 0; 0,5; и 1,0 и 2,0 мл раствора ртути до 50 мкг/л (3.16.) в 4 колбы по 100 мл; добавляют 1 % азотной кислоты (3.2.); дополняют деминерализованной водой (3.1.).

5.2. **Подготовка образцов (рисунок 2)**

Вино минерализуется в аппарате, изготовленном из пирексного стекла и состоящего из трех элементов, соединенных сферическим хонингом: баллон емкостью 250 мл, камера для рекуперации паров, охладитель.

С помощью пипетки вносят 20 мл вина в реакционную колбу объемом 250 мл; собирают аппарат для минерализации.

Медленно добавляют 5 мл серной кислоты (3.6.) и 10 мл азотной кислоты (3.4.); оставляют на ночь.

Медленно нагревают обратным холодильником до исчезновения паров азота; оставляют охлаждаться. Собирают сконденсированные пары в реакционную колбу. Промывают приемник деминерализованной водой. Переливают содержимое реакционной колбы в объемную колбу на 100 мл. Добавляют раствор перманганата калия (3.8.) до появления цвета. Выпавший осадок (MnO_2) с помощью восстановительного раствора (3.10.) переводят в растворимую форму. Доливают деминерализованной водой (3.1.).

Проводят холостой тест с деминерализованной водой.

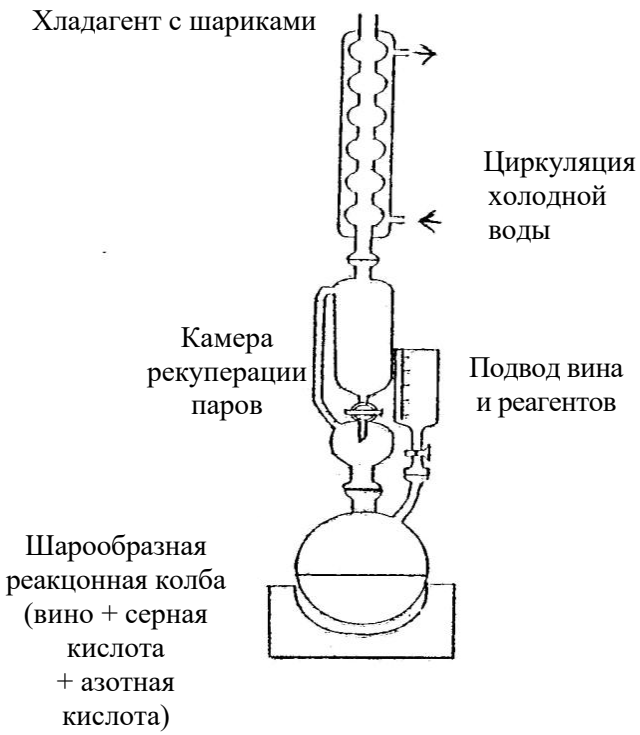


Figure n°2.

Рисунок 2. Аппарат для минирализации

6. ПОРЯДОК РАБОТЫ

6.1 Аналитические измерения

Включают флуориметр; аппарат будет готов к работе через 15 минут. Отжимной насос поглощает холостой раствор (3.3), двухвалентное олово II (3.13) и калибровочные образцы (5.1) или (5.2.) Убеждаются, что в газожидкостном сепараторе возникает барботирование. Последовательно вводят калибровочные образцы (5.1); запускают программу генератора паров. Компьютерная программа создает калибровочную кривую (процент флуоресценции в зависимости от концентрации ртути мкг/л). Затем вводят образцы (5.2).

6.2 Автоматическая проверка

Для проверки возможных отклонений спектрофлуориметра через каждые пять тестов проводится холостой анализ и калибровка.

7. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты выдаются компьютерной программой и выражаются в мкг/л. Вычисляют концентрацию ртути в вине в мкг/л с учетом разбавления 1/5.

4 ПРОВЕРКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества осуществляется путем помещения эталонного материала с известным содержанием ртути, после серии калибровок и через каждые 5 проб. В аналитической серии эталонным материалом является красное вино, сухое белое вино или сладкое белое вино.

Контрольная карта устанавливается для каждого используемого эталонного материала. Пределы проверки устанавливаются на: +/- 2SRintra (2SR intra: разброс воспроизводимости).

Расчет неопределенности, проведенный на контрольных картах, привел к эталону для красного вина: 3,4 +/- 0,8 мкг/л и эталону для сухого белого вина: 2,8+/-0,9 мкг/л.

5 БИБЛИОГРАФИЯ

CAYROL M., BRAN S., 1975. Dosage du mercure dans les vins. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°371.

REVUELTA D., GOMEZ R., BARDON A., 1976. Dosage du mercure dans le vin par la methode des vapeurs froides et spectrometrie d'absorption atomique. Feuillet Vert de l' O.I.V. n°494.

CACHO J., CASTELLS J.E., 1989. Determination of mercury in wine by flameless atomic absorption spectrophotometry. Atomic Spectroscopy, vol. 10, n°3.

STOCKWELL P.B., CORNS W.T., 1993. The role of atomic fluorescence spectrometry in the automatic environmental monitoring of trace element analysis. Journal of Automatic Chemistry, vol. 15, n°3, p 79-84.

SANJUAN J., COSSA D., 1993. Dosage automatique du mercure total dans les organismes marins par fluorescence atomique. IFREMER, Rapport d'activite.

AFNOR, 1997. Dosage du mercure total dans les eaux par spectrometrie de fluorescence atomique. XPT 90-113-2.

GAYE J., MEDINA B., 1998. Dosage du mercure dans le yin par analyse en flux continu et spectrofluorimetrie. Feuillet Vert de l' O.I.V. n°1070.

Метод OIV-MA-AS323-07 Метод II типа

МНОГОЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ICP-MS (OIV-Oeno 344-2010)

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данный метод может быть применен для анализа элементов, присутствующих в винах в пределах указанного диапазона и представленного в следующем списке:

- Алюминий от 0,25 до 5,0 мг/л
- Бор от 10 до 40 мг/л
- Бром от 0,20 до 2,5 мг/л
- Кадмий от 0,001 до 0,040 мг/л
- Кобальт от 0,002 до 0,050 мг/л
- Медь от 0,10 до 2,0 мг/л
- Стронций от 0,30 до 1,0 мг/л
- Железо от 0,80 до 5,0 мг/л
- Литий от 0,010 до 0,050 мг/л
- Магний от 50 до 300 мг/л
- Марганец от 0,50 до 1,5 мг/л
- Никель от 0,010 до 0,20 мг/л
- Свинец от 0,010 до 0,20 мг/л
- Рубидий от 0,50 до 1,2 мг/л
- Натрий от 5 до 30 мг/л
- Ванадий от 0,003 до 0,20 мг/л
- Цинк от 0,30 до 1,0 мг/л

Данный метод может также быть использован для анализа других элементов.

В некоторых случаях образец требует минерализации. Это относится к винам, например, с содержанием сахара более 100 г/л, где предварительная минерализация образца просто необходима. В таком случае рекомендуется провести сбраживание азотной кислотой в микроволновой печи.

Данный метод может также быть применен к суслу, но после минерализации.

2.**Сущность метода**

Многоэлементное количественное определение с использованием масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС).

Инжекция и распыление образца в высокочастотной плазме. Плазма вызывает десольватацию, атомизацию и ионизацию элементов в образце. Ионы извлекаются с помощью вакуумной системы, оснащенной ионными линзами. Ионы разделяются в соответствии с отношением массы к заряду в масс-спектрометре, как например в квадрупольном. Обнаружение и количественное определение ионов происходит с помощью системы электронных множителей.

3. РЕАГЕНТЫ И РАСТВОРЫ

3.1 Сверхчистая, деминерализованная вода с удельным сопротивлением ($\geq$ l8 MΩ) в соответствии с ИСО 3696.

2.2 Отвечающий техническим требованиям раствор(ы) (например, 100 мг/л), содержащий(ие) анализируемые металлы. Можно использовать многоэлементные или моноэлементные растворы.

2.3 Раствор индия и/или родия в качестве внутреннего стандарта (обычно 1г/л).

2.4 Азотная кислота $\geq$ 60% (примеси металлов $\leq$ 0,1 мкг/л).

2.5 Аргон, минимальная чистота 99,999%.

3.6 Азот (максимальное содержание примесей: $H_2O \leq 3$ мг/л, $O_2 \leq 2$ мг/л и $CnHm \leq 0{,}5$ мг/л).

Концентрация раствора и внутренние стандарты приведены в качестве справочных данных.

Приготовление стандартных растворов:

Концентрация кислоты в стандартных растворах и в конечном разбавлении образцов вина должна быть одинаковой и не должна превышать 5%. В качестве примера можно привести следующее.

3.7 Базовый раствор (5 мг/л).
Помещают 0,5 мл раствора (3.2) в пробирку объемом 10 мл (4.5) и добавляют 0,1мл азотной кислоты
(3.4). Доливают до 10 мл деминерализованной водой (3.1) и гомогенизируют. Срок годности: 1 месяц.

3.8 Раствор для внутреннего стандарта (1 мг/л).

Используя микропипетки (4.4), помещают 50 мкл раствора индия или родия (3.3), 0,5 мл азотной кислоты (3.4) в 50 мл пробирку (4.6). Доливают до 50 мл деминерализованной водой (3.1) и гомогенизируют.

Срок годности: 1 месяц.

3.9 Стандартные растворы для калибровочной кривой.

Адаптируют диапазон серии стандартов в соответствии с разбавлением образца и используемым оборудованием.
Используют пипетки на 1000 мкл и 100 мкл (4.4).
Срок хранения стандартных растворов: 1 день.
Стандартные растворы могут быть приготовлены гравиметрически.
Добавляют внутренний стандартный раствор в той же концентрации, что и для образцов.

3.10 Вино для внутреннего контроля известных концентраций (аттестованный стандартный образец АСО, внешний стандарт, внутренний стандарт и т.д.).

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1 Масс-спектрометр с индуктивной связью с/без реакционно-столкновительной ячейкой.

4.2 Компьютер с программным обеспечением для обработки данных и принтером.

4.3 Автодозатор (опционально).

4.4 Микропипетки на 1000 мкл и 100 мкл.

4.5 Пластиковые градуированные пробирки объемом 10 мл с насадкой или стеклянные объемные колбы.

4.6 Пластиковые градуированные пробирки объемом 50 мл с насадкой или стеклянные объемные колбы.

Все объемные материалы (микропипетки и пробирки) должны быть должным образом откалиброваны.

Примечание: материалы, которые будут контактировать с образцом, как, например, пробирки и наконечники, должны находиться не менее 24 часов в растворе азотной кислоты (3.4) с концентрацией 10%, а затем быть несколько раз промыты водой (3.1).

5. ПОДГОТОВКА ПРОБ

Образцы игристого вина должны быть дегазированы. Этого можно достичь путем барботирования азотом (3.6) в течение 10 минут или с помощью ультразвуковой ванны.

Осторожно удаляют пробку, не загрязняя вино. Промывают горлышко бутылки в растворе кислоты (2% HNO_3). Пробы вина отбираются непосредственно из бутылки.

С помощью микропипетки (4.4) вносят 0,5 мл вина, 0,1-0,5 мл азотной кислоты (3.4) и 100 мкл раствора внутреннего стандарта (3.8) в 10 мл пробирку (3.5). Доливают воду (3.1) и гомогенизируют.

Для некоторых элементов может потребоваться более высокое разбавление из-за их обычного высокого содержания в образце.

Так как бром (Br) обладает высоким потенциалом ионизации, его ионизация в плазме может быть неполной из-за присутствия высоких концентраций других элементов в винах, обладающих низким потенциалом ионизации. Это может привести к неправильному количественному определению Br, поэтому во избежание ошибок рекомендуется разведение 1/50 (в случае использования другого разведения подтверждают результаты, проверив восстановление после добавления).

Если стандарты готовятся гравиметрически, конечное разбавление образца также должно быть получено гравиметрически.

6. Проведене исследованя

Включают устройство (насос работает, плазма включена).
Очищают систему в течение 20 минут с помощью раствора 2% азотной кислоты (3.4).
Проверяют правильность работы устройства.

Анализируют холостой образец и серию стандартных растворов в возрастающих концентрациях, затем стандартный раствор (например, № 2 из серии 3.9) для проверки правильности калибровки и, в конце, холостой образец, чтобы убедиться в отсутствии эффекта памяти. Считывают образцы в двух экземплярах. Для внутреннего контроля используют вино известной концентрации (3.10) в целях подтверждения согласованности результатов.

Элемент	м/з (масса/заряд)*
Алюминий	27
Бор	11
Бром	79
Кадмий	114
Кобальт	59
Медь	63
Стронций	88
Железо	56/57
Литий	7
Магний	24
Марганец	55
Никель	60
Свинец	среднее значение 206, 207 и 208
Рубидий	85
Натрий	23
Ванадий	51
Цинк	64

** Приведенная выше таблица дана в качестве примера. В зависимости от оборудования могут потребоваться другие изотопы.*

В случае использования оборудования без реакционно-столкновительной ячейки, для некоторых элементов могут потребоваться уравнения коррекции.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

Программа сама производит расчёты.
Концентрации элементов указываются в мг/л, с точностью до двух знаков после запятой.
Путем интерполяции по калибровочной кривой получают концентрацию элементов в разбавленных образцах. Используют следующее уравнение для расчета концентрации элементов в образце:

$$C = \frac{C_m \times V_t}{V_m}$$

Где:

C = концентрация элемента в образце
C_m = концентрация элементов в разбавленном образце
V_t = конечный объем раствора для измерения, в мл
V_m = объем аликвоты вина, в мл.

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Обеспечивают прослеживаемость, используя сертифицированные стандарты.

В каждой аналитической серии используют CRM (сертифицированный эталонный материал) в качестве внутреннего контроля вина или вино, использованное в качестве эталонного материала в ходе межлабораторных испытаний.

Рекомендуется создавать контрольные графики на основе результатов анализаконтроля качества.

Участие в межлабораторных испытательных проектах.

9. ПРЕЦИЗИОННОСТЬ

Результаты статистических параметров совместного испытания приведены в Приложении А.

9.1 Повторяемость (r)

Разница между двумя независимыми результатами, полученными одним и тем же методом, на одной и той же пробе, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования за короткий промежуток времени. Результаты r приведены в таблицах 1-17 Приложения A

9.2 Воспроизводимость (R)

Разница между двумя результатами, полученными с использованием одного и того же метода, в одной и той же пробе, в другой лаборатории, другим оператором и с использованием другого оборудования. Результаты R приведены в таблицах 1-17 Приложения A.

В таблице 1 представлен % относительного стандартного отклонения повторяемости и воспроизводимости метода (RSDr% и RSDR%). (*) C = концентрация

Элемент	**Концентрация**	**RSD_r %**	**RSD_R %**
Алюминий	0,25 - 5,0 мг/л	4	10
Бор	10 - 40 мг/л	3,8	6,3
Бром	0,20- 1,0 мг/л	4,1	16,3
	≥ 1,0 - 2,5 мг/л	2.1	8,0
Кадмий	0,001 - 0,020 мг/л	0,06 C*+0,18	10
	≥ 0,020 - 0,040 мг/л	1,5	10
Кобальт	0,002 - 0,050 мг/л	3,2	13,2
Медь	0,10 - 0,50 мг/л	3,8	11,4
	≥ 0,50 - 2,0 мг/л	2,0	11,4
Стронций	0,30 - 1,0 мг/л	2,5	7,5
Железо	0,80- 1,0 мг/л	4,2	15,7
	≥ 1,0-5,0 мг/л	4,2	7,8
Литий	0,010 - 0,050 мг/л	7	12
Магний	50 - 300 мг/л	2	6
Марганец	0,50-1,5 мг/л	3	7
Никель	0,010 - 0,20 мг/л	5	8
Свинец	0,010 – 0,050 мг/л	8	7
	≥ 0,050 – 0,20 мг/л	2	7
Рубидий	0,50 - 1,2 мг/л	3	6
	5 - 10 мг/л	2	10

Натрий	≥ 10 - 30 мг/л	0,3 C*-2,5	10
Ванадий	0,003 – 0,010 мг/л	8	10
	≥ 0,010 – 0,20 мг/л	3	10
Цинк	0,30 – 1,0 мг/л	5	12

Таблица 1: относительное стандартное отклонение повторяемости и воспроизводимости

10. БИБЛИОГРАФИЯ

ISO 5725:1994, *Точность методов испытаний - Определение повторяемости и воспроизводимости для стандартного метода испытаний путем межлабораторного испытания.*

ISO 17294:2004.

ALMEIDA M. R, VASCONCELOS T, BARBASTE M. y MEDINA B. (2002), Anal. Bioanal Chem., 374, 314-322.

CASTIÑEIRA *et al.* (2001), Frenesius J. Anal. Chem., 370, 553-558.

DEL MAR CASTIÑEIRA GOMEZ *et al.* (2004), J. Agric Food Chem., 52, 2962-2974.

MARISA C., ALMEIDA M. et VASCONCELOS T. (2003), J. Agric. Food Chem., 51, 3012-3023.

MARISA *et al.*, (2003), J. Agric Food Chem., 51, 4788-4798.

PÉREZ-JORDAN M. Y., SOLDEVILLA J., SALVADOR A., PASTOR A y de la GURDIA M. (1998), J. Anat. At. Spectrom., 13, 33-39.

PEREZ-TRUJILLO J.-P., BARBASTE M. y MEDINA B. (2003), Anal. Lett., 36(3), 679-697.

TAYLOR *et al.* (2003), J. Agric Food Chem., 51, 856-860.
THIEL *et al.* (2004), Anal. Bioanal. Chem, 378, 1630-1636.

ПРИЛОЖЕНИЕ A

РЕЗУЛЬТАТЫ СОВМЕСТНЫХ ИСПЫТАНИЙ

Метод был проверен в ходе двух совместных испытаний, точность оценивалась в соответствии с ИСО 5725. Достоверность метода получена через восстановительные исследования.

1-е совместное испытание

Были использованы 8 образцов (A, B, C, D, E, F, MH1 и MH2) следующего вида:

- Три образца красного вина, с добавлением и без добавления.
- Три образца белого вина, с добавлением и без добавления.
- Два образца синтетической водно-спиртовой смеси, приготовленной из этанола и воды.

Водно-спиртовой образец MH1 представлял проблемы с нестабильностью во время испытания, поэтому его результаты не были приняты во внимание.

	MH2	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
Металл (мг/л)	Водно-спиртовая смесь	RW2	RW3	WW2	WW3	Натуральное красное вино	Натуральное белое вино
Алюминий	5	0.5	2	2	1	Нет добавл	Нет добавл
Кадмий	0.001	0.005	0.02	0.05	0.01	Нет добавл	Нет добавл
Стронций	0.300	Нет добавл	Нет добавл	Нет добавл	Нет добавл	Нет добавл	Нет добавл
Литий	0.020	0.01	0.02	0.04	0.01	Нет добавл	Нет добавл
Магний	50	100	200	50	25	Нет добавл	Нет добавл
Марганец	0.500	0.5	1	1	0.5	Нет добавл	Нет добавл
Никель	0.070	0.025	0.2	0.1	0.1	Нет добавл	Нет добавл
Свинец	0.010	0.05	0.1	0.15	0.05	Нет добавл	Нет добавл
Рубидий	1.0	Нет добавл	Нет добавл	Нет добавл	Нет добавл	Нет добавл	Нет добавл
Натрий	20	10	10	20	5	Нет добавл	Нет добавл
Ванадий	0.010	0.05	0.2	0.1	0.1	Нет добавл	Нет добавл
Цинк	0.500	0.1	1	0.5	0.5	Нет добавл	Нет добавл

2-е совместное исследование

Были использованы 16 образцов (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P) следующего вида:

- Четыре образца красного вина с добавлением и без добавления.
- Четыре образца портвейна, с добавлением и без добавления.
- Шесть образцов белого вина, с добавлением и без добавления.
- Два образца шампанского.

Количества, добавленные к образцам

Образцы	**Код**	**Добавление**	**B**	**Co**	**Cu**	**Fe**
			мг/л	**мкг/**	**мг/л**	**Мг/л**
Белое вино	Ф-Н	Нет добавл.	0.0	0.0	0.0	0.0
	С-I	Добавление 1	5.0	5.0	5.0	1.0
	А-О	Добавление 2	10.0	10.0	1.0	2.0
Ликерное вино	Б-К	Нет добавл.	0.0	0.0	0.0	0.0
	Е-L	Добавление 3	15.0	20.0	1.5	3.0
Красное вино	D-M	Нет добавл.	0.0	0.0	0.0	0.0
	Н-J	Добавление 4	20.0	50.0	2.0	5.0
Игристое вино	G-P	Нет добавл.	0.0	0.0	0.0	0.0

ПАРАМЕТРЫ ПРЕЦИЗИОННОСТИ (таблицы1-17):

Значения $Horrat_r$ и $Horrat_R$ были получены с помощью уравнения Горвица с учетом модификаций Томпсона для концентрации ниже 120 мкг/л.

Таблица 1: Алюминий (мг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	10	0,68	0,020	0,06	2,9	11	0,26	0,077	0,22	11	17	0,66
B	11	9	2,1	0,043	0,12	2,0	9,4	0,22	0,21	0,61	10	14	0,71
C	11	9	2,1	0,032	0,09	1,5	9,5	0,16	0,21	0,59	10	14	0,69
D	11	10	1,2	0,041	0,12	3,4	10	0,34	0,10	0,29	8,3	16	0,56
E	11	10	0,34	0,014	0,04	4,1	12	0,34	0,029	0,08	8,5	19	0,46
F	11	10	0,27	0,006	0,02	2,2	13	0,17	0,028	0,08	10	20	0,52
MH2	11	8	5,2	0,26	0,73	5,0	8,2	0,60	0,56	1,6	11	13	0,86

Таблица 2: Бор (мг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	8	6	18	0,77	2,2	4,3	6,8	0,62	0,94	2,69	5,2	10	0,50
B-K	8	4	4,5	0,27	0,76	6,0	8,4	0,72	0,40	1,14	8,9	13	0,70
C-I	8	4	13	0,31	0,89	2,4	7,2	0,33	0,33	0,94	2,5	11	0,24
D-M	8	7	11	0,26	0,74	2,4	7.4	0,31	1,1	3,11	10	11	0,90
E-L	8	5	21	0,47	1,3	2,2	6.7	0,33	0,85	2,43	4,0	10	0,40
F-N	8	5	8,3	0,43	1,2	5,2	7.7	0,68	0,47	1,34	5,7	12	0,48
G-P	7	4	3,1	0,094	0,27	3,0	8.9	0,34	0,18	0,51	5,8	14	0,43
H-J	8	5	31	1,0	3,0	3,2	6.3	0,54	1,6	4,43	5,2	9,6	0,52

Таблица 3: Бром (мг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	6	2	1,21	0,028	0,08	2,3	10,3	0,22	0,041	0,12	3,	15,6	0,22
B-K	5	2	0,19	0,006	0,02	2,9	13,6	0,21	0,0043	0,012	2,	20,5	0,11
C-I	6	3	0,81	0,017	0,05	2,1	10,9	0,19	0,062	0,18	7,	16,5	0,47
D-M	6	4	0,38	0,017	0,05	4,5	12,2	0,37	0,066	0,19	17,4	18,5	0,94
E-L	6	3	1,72	0,030	0,09	1,7	9,7	0,17	0,22	0,62	12,8	14,8	0,86
F-N	6	3	0,22	0,014	0,04	6,4	13,3	0,48	0,046	0,13	20,9	20,1	1
H-J	6	2	2,30	0,061	0,17	2.7	9,3	0,28	0,092	0,26	4	14.1	0.28

Таблица 4: Кадмий (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	12	11	6	0,2	0,6	3,3	15	0,22	1	3	1	22	0,77
B	12	11	16	0,4	1	2,5	15	0,17	2	6	1	22	0,59
C	12	9	40	0,4	1	1,0	15	0,07	3	8	7,	22	0,34
D	12	10	10	0,3	0,8	3,0	15	0,20	0,9	3	9,	22	0,41
E	8	7	0,3	0,20	0,6	67	15	4,47	0,20	0,67	6	22	3,05
F	8	6	0,3	0,04	0,1	13	15	0,87	0,20	0,45	6	22	3,05
MH2	9	5	0,9	0,08	0,2	8,9	15	0,59	0,10	0,29	1	22	0,50

Таблица 5: Кобальт (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	10	6	22	0,5	1	2,3	15	0,15	2	6	9	22	0,41
B-K	10	6	8	0,3	0,9	3,8	15	0,25	1	4	1	22	0,59
C-I	10	8	19	0,4	1	2,1	15	0,14	3	7	1	22	0,73
D-M	10	3	3	0,07	0,2	2,3	15	0,15	0,1	0,3	3	22	0,15
E-L	10	8	27	1	3	3,7	15	0,25	3	9	1	22	0,50
F-N	10	7	12	0,5	2	4,2	15	0,28	1	4	8	22	0,38
G-P	9	5	2	0,2	0,5	10	15	0,67	0,3	0,8	1	22	0,68
H-J	10	6	49	0,5	1	2,3	15	0,15	6	18	1	22	0,55

Таблица 6: Медь (мг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	10	8	1,1	0,013	0,040	1,2	10	0,12	0,11	0,32	10	16	0,63
B-K	10	8	0,21	0,006	0,020	2,9	13	0,22	0,021	0,060	10	20	0,50
C-I	10	7	0,74	0,009	0,030	1,2	10	0,12	0,046	0,13	6,2	17	0,36
D-M	10	8	0,14	0,007	0,020	5,0	14	0,36	0,015	0,043	11	22	0,50
E-L	10	9	1,7	0,061	0,17	3,6	7,8	0,5	0,16	0,46	9,0	15	0,60
F-N	10	7	0,16	0,006	0,020	3,8	14	0,27	0,029	0,083	18	21	0,86
G-P	9	4	0,042	0,004	0,010	9,5	15	0,63	0,006	0,017	14	22	0,64
H-J	10	7	2,1	0,018	0,050	0,86	9,5	0,09	0,24	0,69	11	14	0,79

Таблица 7: Стронций (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	12	11	1091	33	93	3,0	10	0,30	78	222	7,2	16	0,45
B	12	8	1139	66	188	5,8	10	0,58	69	195	6,1	16	0,38
C	12	9	328	6	18	1,8	13	0,14	19	54	5,8	19	0,31
D	12	10	313	7	20	2,2	13	0,17	22	61	7,0	19	0,37
E	12	10	1176	28	80	2,4	10	0,24	86	243	7,3	16	0,46
F	12	10	293	3	9	1,0	13	0,08	22	62	7,5	19	0,39
MH2	12	9	352	7	19	2,0	12	0,17	24	69	6,8	19	0,36

Таблица 8: Железо (мг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	10	6	3,2	0,017	0,05	0,53	8,9	0,06	0,23	0,66	7,2	13	0,55
B-K	10	6	1,5	0,085	0,24	5,7	9,9	0,58	0,11	0,31	7,3	15	0,49
C-I	10	5	2,1	0,036	0,10	1,7	9,4	0,18	0,18	0,51	8,6	14	0,61
D-M	10	5	3,1	0,033	0,094	1,1	8,9	0,12	0,29	0,83	9,4	14	0,67
E-L	10	5	4,3	0,120	0,34	2,8	8,5	0,33	0,29	0,83	6,7	13	0,52
F-N	10	6	1,1	0,051	0,15	4,6	10	0,46	0,16	0,46	15	16	0,94
G-P	9	6	0,83	0,024	0,07	2,9	11	0,26	0,14	0,40	17	16	1,06
H-J	10	7	7,8	0,180	0,52	2,3	7,8	0,29	1,2	3,52	15	12	1,25

Таблица 9: Литий (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	11	34	2	5	5,9	15	0,39	4	11	11	22	0,50
B	11	11	42	3	8	7,1	15	0,47	4	12	10	22	0,45
C	11	11	47	1	4	2,1	15	0,14	5	13	9,8	22	0,45
D	11	11	18	1	4	5,6	15	0,37	2	7	14	22	0,64
E	11	11	25	1	3	4,0	15	0,27	3	9	12	22	0,55
F	11	9	9	0,3	1	3,8	15	0,25	0,6	2	7,2	22	0,33
MH2	11	7	22	1	3	4,6	15	0,31	1	3	5,3	22	0,24

Таблица 10: Магний (мг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	10	7	182	2,9	8,1	1,6	4,3	0,37	9,3	26	5,1	7,3	0,70
B	10	6	280	3,9	1	1,4	4,5	0,31	6,0	17	2,1	6,9	0,30
C	10	7	104	2,4	6,9	2,3	5,3	0,43	6,8	19,25	6,5	8,0	0,81
D	10	6	85	1,4	4,0	1,7	5,4	0,31	2,2	6,1	2,6	8,2	0,32
E	10	7	94	2,2	6,2	2,3	5,3	0,43	5,5	16	5,9	8,1	0,73
F	10	7	65	0,95	2,7	1,5	5,6	0,27	3,8	11	5,9	8,5	0,69
MH2	10	7	51	0,90	2,5	1,8	5,8	0,31	2,4	6,9	4,	8,9	0,53

Таблица 11: Марганец (мг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	10	1,3	0,014	0,040	1,1	10	0,11	0,13	0,37	10	15	0,67
B	11	9	1,8	0,14	0,40	7,8	9,7	0,80	0,20	0,56	11	15	0,73
C	11	8	1,5	0,028	0,080	1,9	9,9	0,19	0,084	0,24	5,6	15	0,37
D	11	8	1,0	0,035	0,10	3,5	11	0,32	0,049	0,14	4,9	16	0,31
E	11	9	0,84	0,019	0,050	2,3	11	0,21	0,057	0,16	6,8	16	0,43
F	11	9	0,59	0,015	0,040	2,5	11	0,23	0,031	0,090	5,3	17	0,31
MH2	11	8	0,52	0,029	0,080	5,6	12	0,47	0,037	0,10	7,1	18	0,39

Таблица 12: Никель (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	10	40	2	6	5,0	15	0,33	5	13,90	1	22	0,59
B	12	10	194	7	20	3,6	14	0,26	17	48,96	8,	21	0,42
C	12	8	148	4	10	2,7	14	0,19	5	15,12	3,	21	0,16
D	12	8	157	4	12	2,6	14	0,19	8	23,10	5,	21	0,24
E	11	8	15	0,6	2	4,0	15	0,27	1	3,33	6,	22	0,30
F	12	9	66	1	4	1,5	15	0,10	4	10,58	6,	22	0,28
MH2	11	7	71	5	14	7,0	15	0,47	4	11,41	5,	22	0,25

Таблица 13: Свинец (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	12	9	59	1	4	1,7	15	0,11	3	9	5,1	22	0,23
B	12	10	109	2	6	1,8	15	0,12	8	23	7,3	22	0,33
C	12	9	136	3	9	2,2	14	0,16	13	37	9,6	22	0,44
D	12	9	119	2	6	1,7	15	0,11	5	13	4,2	22	0,19
E	12	10	13	1	3	7,7	15	0,51	1	4	7,7	22	0,35
F	12	9	92	1	4	1,1	15	0,07	4	11	4,4	22	0,20
MH2	12	10	13	1	3	7,7	15	0,51	1	3	7,7	22	0,35

Таблица 14: Рубидий (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	6	717	14	41	2,0	11	0,18	13	36	1,8	17	0,11
B	11	7	799	25	70	3,1	11	0,28	30	86	3,8	17	0,22
C	11	8	677	10	27	1,5	11	0,14	34	96	5,0	17	0,29
D	11	7	612	18	51	2,9	11	0,26	18	50	2,9	17	0,17
E	11	9	741	19	53	2,6	11	0,24	66	187	8,9	17	0,52
F	11	9	617	10	28	1,6	11	0,15	43	123	7,0	17	0,41
MH2	11	7	1128	10	28	0,89	10	0,09	64	181	5,7	16	0,36

Таблица 15: Натрий (мг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	10	9	19	0,59	1,7	3,1	6,8	0,46	2,2	5,7	12	10	1,20
B	10	9	20	1,3	3,6	6,5	6,7	0,97	2,2	6,3	11	10	1,10
C	10	7	28	0,33	0,93	1,2	6,4	0,19	1,9	5,4	6,8	9,7	0,70
D	10	8	11	0,24	0,68	2,2	7,4	0,30	1,1	3,0	10	11	0,91
E	10	8	9,8	0,19	0,53	1,9	7,5	0,25	0,89	2,5	9,1	11	0,83
F	10	8	6,1	0,093	0,26	1,5	8,1	0,19	0,74	2,1	12	12	1,00
MH2	10	8	24	1,8	5,0	7,5	6,6	1,14	2,6	7,2	11	9,9	1,11

Таблица 16: Ванадий (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	12	11	46	1	3	2,2	15	0,15	5	13	1	22	0,50
B	12	11	167	5	1	3,0	14	0,21	19	54	1	21	0,52
C	12	11	93	3	8	3,2	15	0,21	12	33	1	22	0,59
D	12	9	96	3	8	3,1	15	0,21	8	22	8,	22	0,38
E	10	7	3	0,2	0,7	6,7	15	0,45	0,3	0,9	1	22	0,45
F	10	8	3	0,2	0,6	6,7	15	0,45	0,2	0,7	6,	22	0,30
MH2	12	9	11	0,3	1	2,7	15	0,18	0,9	3	8,	22	0,37

Таблица 17: Цинк (мкг/л)

ОБРАЗЕЦ	№ лаборат.	Принято	Vréf	Sr	r	RSD r (%)	RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	8	405	22	61	5,4	12	0,45	45	128	1	18	0,61
B	11	9	1327	49	138	3,7	10	0,37	152	429	1	15	0,73
C	11	9	990	14	41	1,4	11	0,13	86	243	8	16	0,54
D	11	9	1002	28	79	2,8	11	0,25	110	310	1	16	0,69
E	11	9	328	13	37	4,0	13	0,31	79	224	2	19	1,26
F	11	9	539	15	42	2,8	12	0,23	61	172	1	18	0,61
MH2	11	8	604	72	204	12	11	1,09	89	251	1	17	0,88

Метод OIV-MA-AS323-08 Метод II типа

Анализ остатков пестицидов в вине после экстракции по методу QuEChERS

(Резолюция Oeno 436/2012)

1. ВВЕДЕНИЕ

В подготовке данного метода анализа, достоверность которого была подтверждена лабораторией [1] и [2], использовались несколько справочных документов.

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данный метод определяет этапы извлечения остатков пестицидов в вине с использованием метода QuEChERS (*мини-множественно-группой метод анализа пестицидов)* и анализа полученных экстрактов методом ГХ/МС и/или ЖХ/МС-МС.

3 СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Образец экстрагируется с помощью ацетонитрила, после чего происходит разделение жидкость-жидкость, вызванное добавлением сульфата магния и хлорида натрия и буферизацией цитратными солями. Затем экстракт очищается с помощью аминоадсорбента (дисперсионная твердофазная экстракция ТФЭ с персульфатом аммония АПС и сульфатом магния). Для улучшения стабильности экстракты подкисляют при хранении, добавляя небольшое количество муравьиной кислоты. Готовый экстракт может быть использован непосредственно для определения методом ГХ/МС и ЖХ/МС-МС.
Для анализов методом ЖХ/МС-МС дисперсионная твердофазная экстракция (ТФЭ) не является необходимой.

4. РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

4.1. Общие положения и вопросы безопасности

Пестициды потенциально токсичны, поэтому для защиты аналитиков необходимо применять безопасные методы работы с ними, особенно при приготовлении исходных растворов из коммерчески доступных активных ингредиентов.

Принимают все необходимые меры предосторожности для предотвращения загрязнений воды, растворителей и других продуктов пестицидами.

Если нет дополнительных указаний, используют реактивы проверенного аналитического качества.

4.2 Вода, качество ВЭЖХ

4.3 Ацетонитрил [75-05-8] Качество ВЭЖХ

4.4 Метанол [67-56-1], качество ВЭЖХ

4.5 Магния сульфат безводный [7487-88-9], частицы

4.6 Сульфат магния, безводный [7487-88-9], мелкий порошок

4.7 Хлорид натрия [7647-14-5]

4.8 Натрия гидроген цитрат, полуторагидрат [6132-05-4]

4.9 Тринатрия цитрат дигидрат [6132-04-3]

4.10 Смесь буферных солей для экстракции:

Взвешивают 4 г безводного сульфата магния в виде частиц, 1 г хлорида натрия, 1 г дигидрата цитрата тринатрия и 0,5 г полуторагидрата цитрата дигидрогената натрия, помещают эти реактивы в колбу. Предварительное смешивание солей позволяет избежать образования кристаллов.

4.11 Раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле

Разбавляют 0,5 мл муравьиной кислоты до объема 10 мл ацетонитрилом.

4.12 Адсорбент первичного и вторичного амина (PSA)

Например, Bondesil-PSA® 40 мкм Varian N° 12213023 1

4.13 Внутренние стандартные растворы и стандартные растворы для контроля качества

В качестве внутренних стандартов можно использовать несколько соединений: например, трифенилфосфат [115-86-6] и трифенилметан [519-73- 3].
Используют стандарт контроля качества для определения эффективности извлечения остатков из образцов: например, трис (1,3дихлоризопропил)фосфат или TCPP.

Необходимо приготовить растворы подходящей концентрации.

Пример: приготовление раствора TCPP на 10 мг/л

Помещают в 50-мл объемную колбу 1 мл базового раствора, содержащего 500 мг/л трис(1,3- дихлоризопропил)фосфата, и доводят объем ацетонитрилом.

4.14 Диапазоны калибровки; стандартные растворы, содержащие различные активные ингредиенты

4.14.1 Стандартные базовые растворы

Готовят базовые растворы с концентрацией активных веществ 500 мг/л в соответствующем растворителе (например, ацетоне).
Хранят при температуре -18°C.

4.14.2 Растворы заменители

Смесь активных ингредиентов, подобранная в соответствии с используемым оборудованием (ГХ или ЖХ), соотнесенная с ограничениями по диапазону калибровки.

4.14.3 Диапазон калибровки

Стандартные растворы в ацетонитриле

Калибровочный диапазон готовится из растворов заменителей с целью получения калибровочной линии от 20 до 500 мкг/л.

Стандартные растворы в винной матрице

В соответствии с протоколом 6.1.1 из вина, не содержащего никаких активных ингредиентов, готовится холостая матрица, далее она дополняется растущим количеством активных ингредиентов с целью получения калибровочной линии от 20 до 500 мкг/л.

5. Оборудование

5.2. Стеклянная посуда и объёмометрическое лабораторное оборудование:

5.2.1. Колбы с пробками объемом 100 мл

5.2.1. Одноразовые центрифужные пробирки объемом 50 мл и 12 мл с завинчивающимися пробками
5.2.2. Градуированные пробирки 10 мл класса А
5.2.3. Волюметрические колбы 10 мл, 50 мл и 100 мл класса А
5.2.4. Волюметрические аппараты с поршневым приводом и объемом от 30 мкл до 1000 мкл, проверенные в соответствии с ИСО 8655-6
5.2.5. шприцы для отбора проб объемом 2 мл

5.3. Нейлоновые микрофильтры с размером пор 0,45 мкм

5.4. Аналитические весы

5.5. Высокоскоростное перемешивающее устройство (например, вихревой смеситель)

5.6. Центрифуга для пробирок объемом 50 мл и 12 мл, способная генерировать 3 000 г.

5.7. Система ЖХ/МС-МС с интерфейсом ионизации электро-распылением.

5.8. Система ГХ/МС, оснащенная подходящими устройствами впрыска и обнаружения (например, ионной ловушкой или тройным квадруполем).

6 ВЫПОЛНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1. Подготовка образцов

6.1.1. Извлечение с использованием метода QuEchERS

Помещают 10 г или отмеряют 10 мл образца (вина) в центрифужную пробирку, добавляют 10 мл ацетонитрила и 100 мкл 10 мг/л раствора трис(1,3-дихлоризопропил)фосфата. Энергично встряхивают в течение 1 минуты. Вливают смесь солей (4.10) в центрифужную пробирку, содержащую жидкую смесь.

Энергично встряхивают в течение 1 минуты. Центрифугируют в течение 5 минут при 3 000 г.

Фильтруют приблизительно 1 мл раствора через фильтры Nylon 25мм/45 мкм для подготовки ЖХ-МС к анализу.

6.1.2. Очистка экстракта с использованием аминоадсорбента

(дисперсионная ТФЭ с персульфатом аммония АПС).

Помещают 6 мл фазы ацетонитрила, описанной в п. 6.1.1. в центрифужную пробирку, содержащую 900 мг сульфата магния в виде мелкого порошка (4.6)

и 150 мг АПС (4.12). Закупоривают пробирку и энергично встряхивают в течение30 с, центрифугируют в течение 5 мин при 3 000 g. Не делая паузы, выделяют и подкисляют очищенный таким образом экстракт, добавив 50 мкл растворамуравьиной кислоты (4.11).

Проводят анализ методом ГХ-МС.

ПРИМЕЧАНИЕ: для минимизации влияния матрицы в экстракты проб и калибровочные растворы можно добавить раствор "защитных" агентов [3].

Для приготовления 10 мл раствора "защитных" агентов:
Взвешивают 15 мг сорбита, 300 мг этилглицерина и 100 мг глюконолактона. Добавляют 2 мл воды
Доводят до 10 мл с помощью ацетонитрила.

20 мкл этого раствора добавляют в каждую колбу, содержащую калибровочные растворы (1 мл) и экстракты образцов (1 мл).

6.2. Результаты и расчеты

6.2.1. Идентификация остатков

Остатки идентифицируются с учетом определенных параметров:
- времени их хранения
- их масс-спектров
- по относительному обилию ионных фрагментов (рекомендуется работать с 1 или 2 MS/MS переходами и 2 или 3 ионами в MS).

6.2.2. Количественная оценка

Экстракты, полученные в пунктах 6.1.1 и 6.1.2, могут быть проанализированы с использованием различных инструментов, параметров и колонок. Однако условия должны быть адаптированы для каждого соединения в зависимости от используемых приборов с целью получения наилучшей чувствительности.

Используют стандартные растворы для подготовки 5-точечного калибровочного диапазона при проверке линейности каждого активного ингредиента.

Концентрацию в мг/кг (или мг/л) для каждого идентифицированного вещества получают непосредственно из калибровочной линии.

6.2.3. Эффективность экстракции

Эффективность экстракции можно проверить, добавив к образцам стандарт контроля качества, например, TCPP (см. 6.1.1). Эффективность должна составлять от 70 до 120%.

Результаты эффективности не учитываются при корректировке содержания остатков в винах, но позволяют проверить правильность процедуры.

7. НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

Результаты валидации, проведенной в соответствии с MA-F-AS1-08- FIDMET [4] и MA-F-AS1-09-PROPER [5], указаны в таблице ниже.
Средние показатели восстановления составляют от 70% до 120% (уровни пиков охватывали диапазон концентраций от 0,020 мг/л до 0,200 мг/л)

7.1 Повторяемость (выраженная в CVr %)
Повторяемость (выраженная как CVr %) в среднем равна 10%.

7.2 Воспроизводимость (выраженная в CVR %)
Воспроизводимость (выраженная как CVR %) в среднем равна 30%.

	Степень восстановления %.	**CV_r%**	**CV_R%**	**HorRat**
Металаксил	89	7	26	1.1
Хлорпирифос этил	81	13	23	1.0
Тебуконазол	99	9	32	1.3
Ципродинил	93	9	29	1.1
Тебуфенозид	102	11	28	1.2
Флудиоксонил	101	7	40	1.4
Беналаксил	98	9	29	1.1
Ципроконазол	92	11	31	1.3
Тебуфенпирад	95	10	31	1.2
Пираклостробин	116	6	29	1.2
Винклозолин	84	9	28	1.1
Мепанипирим	82	11	30	1.1
Боскалид	95	7	28	1.1
Ипроваликарб	106	7	33	1.2
Ипродион	108	10	27	1.1
Процимидон	100	11	34	1.2
Пириметанил	75	12	27	1.0
Карбендазим	113	11	41	1.6
Фенбуконазол	94	6	48	2.0
Фенитротион	90	13	36	0.7
Метрафенон	93	8	19	0.7
Пенконазол	109	8	35	1.1
Флузилазол	93	8	37	1.3
Оксадиксил	86	8	37	1.3
Азоксистробин	84	8	30	1.2
Диметоморф	90	9	36	1.4
Фенгексамид	87	8	22	0.8

Все результаты межлабораторных испытаний, в результате которых были получены данные по надежности, представлены в **Приложении А**

8. БИБЛИОГРАФИЯ

[1] P. Paya. J. Oliva. A. Barba. M. Anastassiades. D. Mack. I. Sigalova. B. Tasdelen; "Analysis of pesticides residues using the Quick Easy Cheap Affective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectroscopy detection". *Anal Bioanal Chem.* 2007.

[2] EN 15662: 2008 — Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE — QuEChERS method; January 2009; AFNOR

[3]K. Mastovska. Steven J. Lehotay. and M. Anastassiades; "Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticides residues in food matrixes". *Anal. Chem*. 2005. 77. 8129-8137.

[4]MA-F-A51-08-FIDMET. ON: Reliability of Analytical Methods (resolution oeno 5/99).

[5]MA-F-AS1-09-PROPER. ON: Protocol for the planning. performance and interpretation of performance studies pertaining to methods of analysis (resolution 6/2000).

FV 1410: Results of the inter-laboratory study

ПРИЛОЖЕНИЕ А

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НАДЕЖНОСТИ

В данном документе представлены результаты валидационного исследования для метода анализа остатков пестицидов в вине после экстракции с использованием QuEChERS (FV 1340).

Исследование проводилось в соответствии с документами OIV MA-F-AS1-08-FIDMET и MA-F-AS1-09-PROPER

1 – Лаборатории - участники

В исследовании приняли участие 16 лабораторий:

LABORATOIRE INTER RHONE	Франция
INSTITUT FUR HYGIENE UND UMWELT	Германия
LABORATORIO AGROENOLÓGICO UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL MAULE	Чили
AGRICULTURAL OFFICE OF BORSOD-ABAUJ-ZEMPLEN COUNTY	Венгрия
PESTICIDE RESIDUE ANALYTICAL LABORATORY	Венгрия
AUSTRIAN AGENCY FOR HEALTH AND FOOD SAFETY	Австрия
COMPETENCE CENTER FOR PLANT PROTECTION PRODUCTS	Австрия
LABORATOIRE DEPARTEMENTAL DE LA SARTHE	Франция
LABORATOIRE PHYTOCONTROL	Франция
BENAKI PHYTOPATHOLOGICAL INST. PESTICIDES RESIDUES LAB.	Греция
LABORATOIRE DUBERNET OENOLOGIE	Франция
ARPAL DIPARTIMENTO LA SPEZIA	Италия
ARPA VENETO - SERVIZIO LABORATORI VERONA	Италия
ARPALAZIO - SEZIONE DI LATINA	Италия
ANALAB CHILE S.A.	Чили
LABORATORIO REGIONAL DE LA CCAA DE LA RIOJA	Испания
SCL LABORATOIRE DE BORDEAUX	Франция
ARPA - FVG DIP. DI PORDENONE	Италия

2 - Образцы - анализ активных ингредиентов

Для данного исследования было предложено 12 образцов:

четыре красных вина: A. B. G. H
четыре белых вина: C. D. I. J
два портвейна: E. K
два мускатных вина: F. L

В 12 пробах было определено 27 активных веществ в диапазоне концентраций от 0,015 мг/л до 0,200 мг/л (см. таблицу ниже).

	A ± G *мг/л*	**B ± H** *мг/л*	**C ± I** *мг/л*	**D ± J** *мг/л*	**E ± K** *мг/л*	**F ± L** *мг/л*
Металаксил	0.050	0.040	0.100	0.020		
Хлорпирифос этил	0.100	0.040	0.200	0.020		
Тебуконазол	0.025	0.080	0.050	0.040		
Ципродинил	0.050	0.040	0.100	0.020		
Тебуфенозид	0.050		0.100			
Флудиоксонил	0.025		0.050			
Беналаксил	0.052	0.041	0.104	0.021		
Ципроконазол	0.054	0.086	0.108	0.043		
Тебуфенпирад	0.050	0.040	0.100	0.020		
Пираклостроби	0.050		0.100			
Винклозолин		0.040		0.020	0.050	0.100
Мепанипирим		0.080		0.040	0.025	0.050
Боскалид		0.080		0.040	0.100	0.200
Ипроваликарб					0.050	0.100
Ипродион		0.076		0.038	0.047	0.094
Процимидон		0.020		0.010		
Пириметанил		0.040		0.020		
Карбендазим				0.054		0.027
Фенбуконазол		0.080		0.040		

Фенитротион		0.040		0.020		
Метрафенон		0.040		0.020		
Пенконазол		0.016		0.008		
Флузилазол		0.040		0.020		
Оксадиксил	0.050				0.025	
Азоксистробин	0.100				0.050	
Диметоморф	0.100				0.050	
Фенгексамид	0.100				0.050	

4 – Статистическая оценка

Все необработанные результаты представлены в FV 1410.
Исключенные или малозначимые значения в каждой таблице выделены другим шрифтом.

4.1 Исключенные значения

Некоторые значения исключаются перед оценкой в следующих случаях:

- для оценки повторяемости метода использовался принцип двойных слепых проб: если некоторые лаборатории давали только один результат на парных пробах, это значение исключалось (отмечено в таблицах как "**xxx**")
- когда результаты выражены в формате "менее чем" (отмечено в таблицах как "**xxx**").

Тесты КОХРАНА и ГРАББСА последовательно применялись к парным выборкам для исключения аномальных дисперсий с одной стороны, и аномальных крайних средних значений, с другой. Значения, исключенные обоими этими тестами, представлены в таблицах как "**xxx**".

4.2 Повторяемость - Воспроизводимость

Параметры повторяемости и воспроизводимости сгруппированы в **таблице 1.**
В этой таблице для каждого вещества указаны следующие пункты:

- n: количество выбранных тестов
- средн.: средние результаты

- TR%: средний коэффициент восстановления
- CVr%: повторяемость в % от среднего значения
- CVR%: воспроизводимость в % от среднего значения
- PR CVR%: воспроизводимость в %, рассчитанная по уравнению Горвица (PR CV% = $2C^{-0.1505}$)
- HoR: значение коэффициента HorRaT (CVR% / PR CVR%)

Выбранные критерии оценки:

- коэффициент восстановления от 70% до 120%
- результаты, полученные в условиях воспроизводимости, сравниваются с результатами, предсказанными в соответствии с моделью Горвица с помощью значения коэффициента HorRaT. Воспроизводимые значения считаются удовлетворительными, если это отношение меньше или равно 2
- повторяемость считается удовлетворительной, если она не превышает значения 0,66 x воспроизводимость по Горвицу.

ТАБЛИЦА 1: Показатели надежности

		Красное вино 1	Красное вино 2	Белое вино 1	Белое вино 2	Портвейн	Мускат
металаксил	n	12	13	13	11	8	
	Среднее	0.051	0.041	0.105	0.033	0.014	
	TR%	102	103	82	69		
	CV_r%	6	8	6	9	5	
	CV_R%	26	26	17	26	33	
	$PRCV_R$%	25	26	22	27	30	
	HoR	1.1	1	0.9	0.6	1.1	
хлорпирифос	n	9	12	11	11		
	Среднее	0.073	0.031	0.166	0.018		
	TR%	73	78	83	90		
	CV_r%	11	16	11	15		
	CV_R%	30	27	18	18		
	$PRCV_R$%	24	27	21	29		
	HoR	1.3	1	0.9	0.6		
тебуконазол	n	12	14	15	14		
	Среднее	0.025	0.078	0.05	0.04		
	TR%	100	98	100	100		
	CV_r%	6	10	10	9		
	CV_R%	37	30	30	31		
	$PRCV_R$%	28	23	25	26		
	HoR	1.3	1. 3	1.2	1.2		
ципродинил	n	15	14	13	14		
	Среднее	0.045	0.036	0.098	0.023		
	TR%	90	90	94	96		
	CV_r%	19	6	3	3		
	CV_R%	36	34	13	31		
	$PRCV_R$%	26	26	23	28		
	HoR	1.4	1.3	0.6	1.1		
тебуфенозид	n	10		11			
	Среднее	0.049		0.106			
	TR%	98		106			
	CV_r%	16		6			
	CV_R%	25		30			
	$PRCV_R$%	25		22			
	HoR	1		1.3			

ТАБЛИЦА 1 (продолжение): Показатели надежности

		Красное вино 1	Красное вино 2	Белое вино 1	Белое вино 2	Портвейн	Мускат
флудиоксонил	n	10		11	10		
	Среднее	0.026		0.064	0.015		
	TR%	104		98	100		
	CV_r%	4		8	10		
	CV_R%	47		30	43		
	$PRCV_R$%	28		24	30		
	HoR	1.7		1.2	1.4		
беналксил	n	12	12	12	12		
	Среднее	0.046	0.04	0.099	0.023		
	TR%	88	98	95	110		
	CV_r%	8	7	7	14		
	CV_R%	37	32	25	21		
	$PRCV_R$%	25	26	23	28		
	HoR	1.4	1.2	1.1	0.8		
ципроконазот	n	14	15	14	14		
	Среднее	0.049	0.08	0.095	0.042		
	TR%	91	93	95	98		
	CV_r%	23	7	7	7		
	CV_R%	36	32	25	33		
	$PRCV_R$%	25	23	23	26		
	HoR	1.4	1.4	1.1	1.3		
тебуфенпирад	n	15	14	14	12		
	Среднее	0.042	0.038	0.094	0.021		
	TR%	84	95	94	105		
	CV_r%	21	6	5	6		
	CV_R%	33	31	26	32		
	$PRCV_R$%	26	31	26	32		
	HoR	1.3	1.2	1.1	1.1		
пираклостробин	n	8		9			
	Среднее	0.055		0.121			
	TR%	110		121			
	CV_r%	6		5			
	CV_R%	31		26			
	$PRCV_R$%	25		22			
	HoR	1.2		1.2			

ТАБЛИЦА 1 (продолжение): Показатели надежности

		Красно	Красное	Белое вино 1	Белое вино 2	Портвейн	Мускат
винклозолин	n		10		9	11	11
	Среднее		0.031		0.020	0.039	0.08
	TR%		78		100	78	80
	CV_r%		8		10	14	4
	CV_R%		35		26	27	22
	$PRCV_R$		24		29	26	23
	HoR		1.4		0.9	1	0.9
мепанипирин	n		12		13	10	11
	Среднее		0.063		0.028	0.022	0.046
	TR%		79		70	88	92
	CV_r%		8		24	5	7
	CV_R%		35		36	20	28
	$PRCV_R$		24		27	29	25
	HoR		1.4		1.3	0.7	1.1
боскалид	n	11	12		11	12	11
	Среднее	0.022	0.097		0.034	0.083	0.174
	TR%	105	121		85	83	87
	CV_r%	12	7		6	6	4
	CV_R%	45	30		26	16	17
	$PRCV_R$	28	23		27	23	21
	HoR	1.6	1.3		1	0.7	0.8
ипроваликарб	n	11	12			13	13
	Среднее	0.016	0.016			0.052	0 ?1
	TR%	107	114			104	100
	CV_r%	9	8			5	6
	CV_R%	39	38			28	27
	$PRCV_R$	30	30			25	23
	HoR	1.3	1.3			1.1	1.2
ипродион	n		10		10	10	8
	Среднее		0.079		0.039	0.053	0.101
	TR%		104		103	113	107
	CV_r%		10		7	10	13
	CV_R%		35		24	25	17
	$PRCV_R$		23		26	25	22
	HoR		1.5		0.9	1	0.8

ТАБЛИЦА 1 (продолжение): Показатели надежности

		Красное вино 1	Красное вино 2	Белое вино 1	Белое вино 2	Портвейн	Мускат
процимидон	n		11		11		
	Среднее		0.018		0.011		
	TR%		90		110		
	CV_r%		12		10		
	CV_R%		34		34		
	$PRCV_R$%		29		31		
	HoR		1.2		1.1		
пириметанил	n		15	10	14		
	Среднее		0.036	0.011	0.027		
	TR%		60	46	120		
	CV_r%		9	20	7		
	CV_R%		26	31	25		
	$PRCV_R$%		26	31	28		
	HoR		1	1	0.9		
карбендазим	n				8		9
	Среднее				0.057		0.033
	TR%				106		120
	CV_r%				11		10
	CV_R%				36		45
	$PRCV_R$%				25		27
	HoR				1.5		1.7
фенбуконазол	n		8		7		
	Среднее		0.067		0.042		
	TR%		84		105		
	CV_r%		6		5		
	CV_R%		45		50		
	$PRCV_R$%		24		26		
	HoR		1.9		2		
фенитротион	n		11		10		
	Среднее		0.034		0.019		
	TR%		85		95		
	CV_r%		16		10		
	CV_R%		31		40		
	$PRCV_R$%		27		29		
	HoR		1.2		1.4		

ТАБЛИЦА 1 (продолжение): Показатели надежности

		Красное вино 1	Красное вино 2	Белое вино 1	Белое вино 2	Портвейн	Мускат
метрафенон	n		7		7		
	Среднее		0.038		0.018		
	TR%		95		90		
	CV_r%		8		7		
	CV_R%		18		19		
	$PRCV_R$%		26		29		
	HoR		0.7		0.6		
пенконазол	n		14		13		
	Среднее		0.017		0.009		
	TR%		106		113		
	CV_r%		8		8		
	CV_R%		31		38		
	$PRCV_R$%		30		33		
	HoR		1		1.2		
флузилазол	n		13		13		
	Среднее		0.035		0.019		
	TR%		88		95		
	CV_r%		6		9		
	CV_R%		37		36		
	$PRCV_R$%		26		29		
	HoR		1.4		1.2		
оксадиксил	N	7				10	
	Среднее	0.04				0.023	
	TR%	80				92	
	CV_r%	10				5	
	CV_R%	18				31	
	$PRCV_R$%	26				28	
	HoR	0.7				1.1	
азоксистробин	N	12				13	
	Среднее	0.078				0.045	
	TR%	78				90	
	CV_r%	10				6	
	CV_R%	29				31	
	$PRCV_R$%	23				26	
	HoR	1.2				1.2	

ТАБЛИЦА 1 (продолжение): Показатели надежности

		Красное вино 1	Красное вино 2	Белое вино 1	Белое вино 2	Портвейн	Мускат
диметоморф	N	12		9	9	13	
	Среднее	0.086		0.019	0.019	0.047	
	TR%	86				94	
	CV_r%	6		8	14	8	
	CV_R%	30		41	44	29	
	$PRCV_R$%			29	29	25	
	HoR			1.4	1.5	1.2	
фенгексамид	N	11		11	10	11	
	Среднее	0.083		0.026	0.025	0.039	
	TR%	83		96	93	78	
	CV_r%	7		9	10	7	
	CV_R%	31		18	19	18	
	$PRCV_R$%	23		28	28	26	
	HoR	1.3		0.6	0.7	0.7	

Метод OIV-MA-AS323-09 Метод IV типа

Определение натамицина в винах.

Резолция OIV-SCMA 461-2012

1. ВВЕДЕНИЕ

Используются различные методы для определения натамицина, в основном основанные на высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с диодным детектрированием DAD или масс-спектрометрией MS. Оценка пределов производительности – предел обнаружения и квалификации – зависит от ответственности лабораторий в соответствии с системами аккредитации (например. ISO/EN 17025/2005) использующими MOBB (OENO 7/2000, E-AS1-10-LIMDET) или другие нормативные руководства.
Поскольку отсутствует надежная межлабораторная оценка критического уровня, временно принимается предел решения 5 мкг/л, пока не будет получена надежная межлабораторная оценка или другие надежные индикаторы критического уровня.

2. МЕТОДЫ

2.1 Определение натамицина (пимарицина) в вине с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения.

2.1.1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Этот метод описывает процесс анализа определения натамицина (пимарицина) в вине. Уровень натамицина выражен в микрограммах на литр (мк/л). Внутренняя проверка проводилась с использованием растворителей, красного вина и белого вина с концентрацией в диапазоне 5 - 2600 мкг/л.

2.1.2 СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Уровень натамицина в вине определяется прямым впрыском пробы в жидкостный хроматограф с системой масс-спектрометрического детектрирования высокого разрешения

(LC-HR/MS). Количественная оценка достигается использованием дополнительного стандартного метода. Изначально пробу анализируют в первый раз, чтобы получить оценку концентрации натамицина. Затем анализ проводится повторно с добавлением доз стандартных растворов, более подходящих для концентрации натамицина в образце.

2.1.3 Реактивы

2.1.3.1 Аналиты

2.1.3.1.1 Натамицин (Пимарицин) > 95%

2.1.3.2 Химикаты

2.1.3.2.1 Метанол, ВЭЖХ Флуорисцентная оценка (CAS no. 67-56-1).

2.1.3.2.2 Очищенная вода для лабораторных исследований, к примеру, EN ISO 3696 оценка (вода для аналитических лабораторных исследований – спецификация и методы испытаний [ISO 3696:1987]).

2.1.3.2.3 Уксусная кислота, 100%, (CAS no.64-19-7)

2.1.3.3 Растворы

2.1.3.3.1 Основной раствор натамицина (1000 мкг\мл)

Взвесить с точностью до 0.1 мг приблизительно 10 мг натамицина (2.1.3.1.1) в янтарную мерную колбу, вместимостью 10 мл, и довести до метки метанолом: водой: уксусной кислотой (2.1.3.3.4). Закрыть крышкой и провести ультразвуковое исследование. Рассчитать фактическую концентрацию в микрограммах натамицина на миллилитр раствора.

2.1.3.3.2 Рабочий раствор 1: натамицин (10 мкг/мл)

Поместить 100 мкл основного раствора (2.1.3.3.4) в янтарную мерную колбу 10 мл и довести до отметки метанолом: водой: уксусной кислотой (2.1.3.3.4)

2.1.3.3.3 Рабочий раствор 2: натамицин (0,5 мкг/мл)

Поместить 500 мкл рабочего раствора 1 (2.1.3.3.2) в янтарную мерную колбу 10 мл и довести до отметки метанолом: водой: уксусной кислотой (2.1.3.3.4)

2.1.3.3.4 Раствор метанола: вода: уксусная кислота (50:47:3, об/об)

Используя мерный цилиндр, отмерить 500 мл метанола (3.2.1) в 1 л мерную колбу. Добавить 470 мл воды (2.1.3.2.2) и смешать, встряхнув. Добавить 30 мл уксусной кислоты (2.1.3.2.3) и тщательно встряхнуть.

2.1.3.3.5 Метанол, 3% уксусная кислота

Используя мерный цилиндр, добавить 30 мл уксусной кислоты (2.1.3.2.3) в 1 литровую мерную колбу. Довести до отметки с помощью метанола (2.1.3.2.1) и тщательно встряхнуть.

2.1.3.3.6 Вода, 3% уксусная кислота

Используя мерный цилиндр, добавить 30 мл уксусной кислоты (2.1.3.2.3) в литровую мерную колбу. Довести до отметки водой (2.1.3.2.2) и тщательно встряхнуть.

2.1.4 АПАРАТУРА

ПРИМЕЧАНИЕ: Прибор или устройство указывается в списке только в том случае, если оно специализировано или разработано в соответствии с конкретной спецификацией, предполагается, что обычная лабораторная посуда и оборудование имеются в наличии.

2.1.4.1 Жидкостный хроматограф (ЖХ)

Оснащен автоматическим инжектором, 100 мкл инжекторной петлей и масс-спектрометром высокого разрешения

.

2.1.4.1.1 ЖХ колонка

ЖК колонка способна получать воспроизводимые пики натамицина и способная отличать пики натамицина от ложных пиков, происходящих от матрицы образца и используемых растворителей.

ПРИМЕЧАНИЕ: В зависимости от типа оборудования, используемого для анализа, следует оптимизировать подходящие рабочие условия.

2.1.4.1.2 ВЭЖХ анализ

Данная колонка и следующие параметры были признаны подходящими:

Колонка: аналитическая колонка SunFire C18, 150 x 2.1 мм, 3.5 мкм

Температура колонки: 30 ºC

Скорость потока: 0.25 мл/мин

Объем впрыска: 20 мкл

Мобильная фаза A: Вода:уксусная кислота, 97:3 (об/об) (2.1.3.3.6)

Мобильная фаза B: Метанол:уксусная кислота, 97:3 (об/об) (2.1.3.3.5)

Время хроматографирования: 30 мин

Поддон автодозатора: 8 ºC

Градиент:

Время (мин)	Мобильная фаза A (%)	Мобильная фаза B (%)
0	90	10
25	10	90
27	10	90
27.1	90	10
30	90	10

2.1.4.2 Масс спектрометрическое обнаружение (LC-HR/MS)

Режим ионизации: положительное электрораспыление
Массовое разрешение: m/z/ m/z
AGC цель: Высокоцелевой динамический диапазон
Максимальное время впрыска: 50 мс
Диапазон сканирования: m/z 480-670
Продувочный газ: 60 л/мин
Вспомогательный газ: 5 л/мин
Напряжение распыления: 3.75 V
Натамицин: m/z 666.31069 $[M+H]^+$.
Ион подтверждения: m/z 503.22672
Время удержания: 16.5 мин

2.1.5 Проведение эксперимента

Образцы следует встряхивать для обеспечения однородности перед отбором подобразцов.

2.1.5.1 Отбор

Отмеряют пипеткой 2 мл раствора каждого вида вина и помещают в две 2 мл пробирки для центрифуги Eppendorf. Добавляют 0 мкл и 20 мкл стандартного рабочего раствора натамицина 2 по 0.5 мкл (2.1.3.3.3) в пробирки. Это эквивалентно добавлению 0 мк/л и 5 мк/л натамицина. В течение одной минуты пробирки встряхиваются и затем центрифугируются 10 минут при 14000 об/мин. Фильтруют аликвоту через 0.2 мкм ПТФЭ в янтарную колбу объемом 2 мл. Анализируют с помощью LC-HR/MS (секция 6) и оценивают концентрацию натамицина в образце (секция 7).

Если полученная концентрация натамицина менее 5мкг/л, отмечают данные как < 5 мкг/л. Если полученная концентрация натамицина превышает 5 мкг/л следуют разделу 5.

2.1.5.2 Количественный анализ

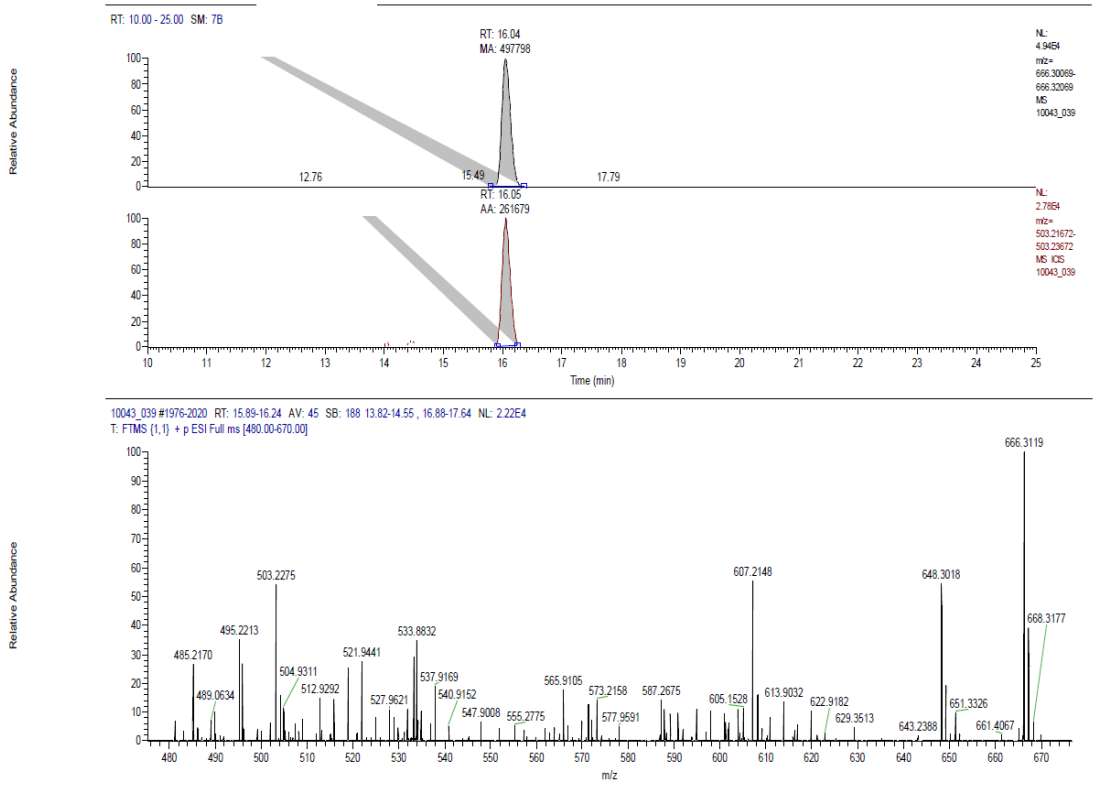
Определение натамицина в образцах с концентрацией свыше 5 мкг/л. Наливают 2 мл вина в 5 2 мл пробиркок для центрифуги Eppendorf и добавляют 0 мкл, 5 мкл, 10 мкл, 20 мкл и 50 мкл стандартного

рабочего раствора натамицина 1 (2.1.3.3.2) во флаконы. Этот эквивалент добавляется к 0 мкл, 25 мкл, 50 мкл, 100 мкл и 250 мкл натамицина. Встряхивают флаконы одну минуту, а затем центрифугируют 10 минут при режиме 14000 об/мин. Процеживают аликвоту через 0.2 мкл ПТФЭ в янтарную колбу объемом 2 мл. Аанализируют LC-HR/MS (секция 6) и оценивают концентрацию натамицина в образце (раздел 7).

2.1.6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: В начале измерений следует проверить базовую стабильность и линейность отклика детектора, а также проверить предел обнаружения. На протяжении всего исследования образцов и стандартов калибровки поддерживают одинаковые условия. Идентифицируют пики натамицина на основе времени удержания и их канала точно измеренной массы и измеряют площадь пиков. Вводят каждый из приготовленных образцов в колонку ЖХ. Измеряют площадь пика натамицина в каждом из каналов количественного определения и подтверждения. Пример типичной хроматограммы представлен на Рисунке 1.

Рисунок 1. Типичная ЖХ-HR/MS хроматограмма и масс-спектр добавления натамицина в пробу белого вина в концентрации 50 мкг/л.



Строят площадь пиков основного канала количественного определения в зависимости от концентрации добавленного натамицина в микрограммах на литр (мкг/л). Определяют наклон, точку пересечения и коэффициент корреляции линии регрессии. Калибровочная кривая должна быть прямой, а коэффициент корреляции должен быть 0.99 или лучше.

2.1.7 ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1.7.1 Вычисление уровня аналита

Концентрация натамицина в пробе в микрограммах на литр (мкг/л) вычисляется с помощью следующей формулы:

$C = b/a$

где C = концентрация натамицина в вине (мкг/л), a = уклон линии регрессии, b = y-точка пересечения линии регрессии

2.1.8 ПОДТВЕРЖДЕНИЕ

Присутствие натамицина в образцах должно быть подтверждено с помощью применения следующих критериев:

Присутствие пика в двух каналах точно измеренной массы *m/z* 666.31069 и *m/z* 503.22672 при одинаковом времени удерживания. Вычисляют отношение площади пиков основного канала количественного определения массы к площади канала подтверждения. Критерий заключается в том, что совпадение этого соотношения на ±25%, получено методами дозированных добавок стандартных растворов.

2.1.9 ДАННЫЕ ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА

2.1.9.1 Линейность

Метод является линейным в диапазоне калибровки от 1 до 2640 мкг/л в растворителе, матрицах белого вина и красного вина (рисунки 2, 3 и 4).

Рисунок 2. Десятиточечный калибровочный график добавления натамицина в растворитель, в диапазоне от 1 до 2600 мкг/л.

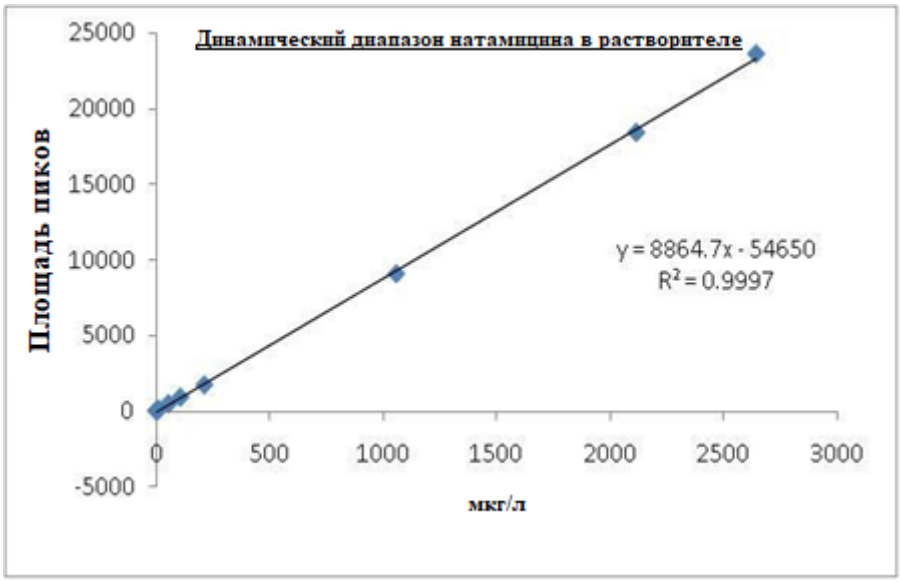


Таблица 1. Калибровочные остатки в растворителе.

Натамицин (мкг/л)	Предполагаемая концентр. (мкг/л)	Остатки	Стандартные остатки
0	6.4	-6.4	-0.4
1.056	6.8	-5.7	-0.3
5.28	10.9	-5.6	-0.3
10.56	16.8	-6.3	-0.4
52.8	58.9	-6.1	-0.3
105.6	108.3	-2.7	-0.2
211.2	200.1	11.1	0.6
1056	1029.8	26.2	1.5
2112	2084.8	27.2	1.6
2640	2671.8	-31.8	-1.8

Рисунок 3. Десятиточечный калибровочный график добавления натамицина в белое вино, в диапазоне от 1 до 2600 мкг/л.

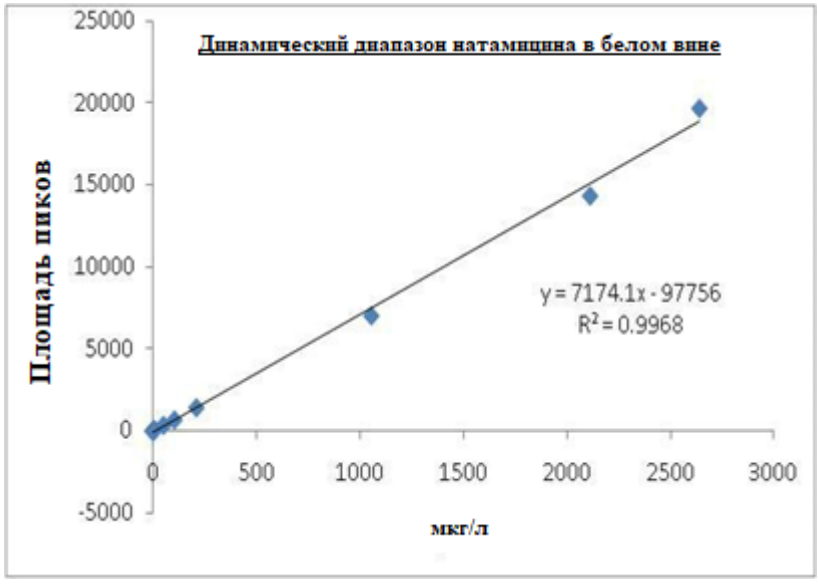


Таблица 2 Калибровочные остатки в матрице белого вина.

Натамицин (мкг/л)	Предполагаемая концентр. (мкг/л)	Остатки	Стандартные остатки
0	15.5	-15.5	-0.3
1.056	15.6	-14.6	-0.3
5.28	18.8	-13.5	-0.2
10.56	23.9	-13.3	-0.2
52.8	63.6	-10.8	-0.2
105.6	109.3	-3.7	-0.1
211.2	212.8	-1.6	0.0
1056	989.0	67.0	1.2
2112	2003.2	108.8	2.0
2640	2742.7	-102.7	-1.8

Рисунок 4. Десятиточечный калибровочный график добавления натамицина в красное вино в диапазоне от 1 до 2600 мкг/л.

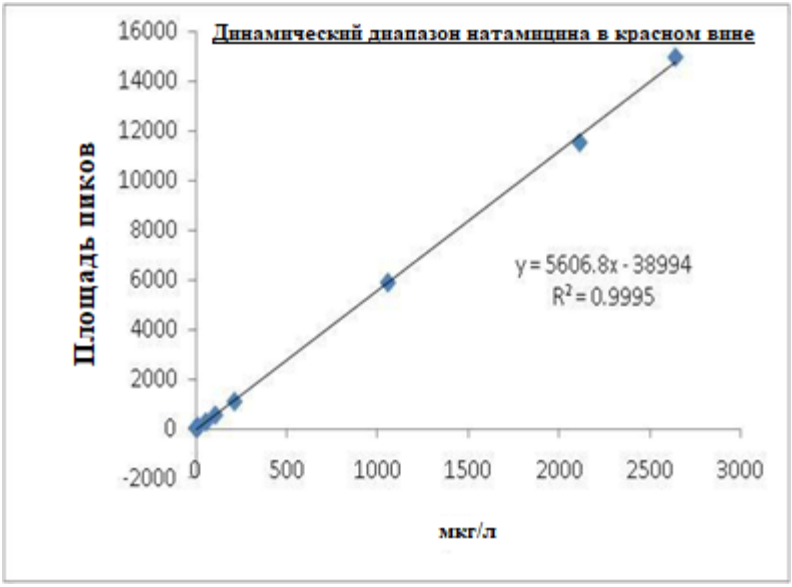


Таблица 3. Калибровочные остатки в матрице красного вина.

Натамицин (мкг/л)	Предполагаемая концентр. (мкг/л)	Остатки	Стандартные остатки
0	7.2	-7.2	-0.3
1.056	8.2	-7.1	-0.3
5.28	10.9	-5.7	-0.3
10.56	16.8	-6.2	-0.3
52.8	52.1	0.7	0.0
105.6	102.1	3.5	0.2
211.2	199.8	11.4	0.5
1056	1055.2	0.8	0.0
2112	2063.7	48.3	2.3
2640	2678.4	-38.4	-1.8

2.1.9.2 Точность и достоверность

Воспроизводимость метода оценивалась при пределе действия 5 мкг/л и при 200 мкг/л в растворителе, в матрицах белого вина и красного вина (таблицы 4, 5 и 6). Точность оценивали по обогащению белого вина и красного вина известным количеством натамицина, на двух разных уровнях.

Затем анализ был представлен вторым аналитиком, который не знал о концентрации добавленного натамицина. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 4. Повторяемость добавления натамицина в растворитель (метанол: вода: уксусная кислота 50:47:3 об/об) при двух разных концентрациях; 5 и 200 мкг/л.

	Концентр. натамицина мкг/л	**Восстановление (%)**
Ст. растворитель при 5 нг/мл повт. 1	5.	99.7
Ст. растворитель при 5 нг/мл повт. 2	5.	101.8
Ст. растворитель при 5 нг/мл повт. 3	5.	108.6
Ст. растворитель при 5 нг/мл повт. 4	5.	108.2
Ст. растворитель при 5 нг/мл повт. 5	5.	109.0
Ст. растворитель при 5 нг/мл повт. 6	5.	112.2
Ст. растворитель при 5 нг/мл повт. 7	5.	108.4
Ст. растворитель при 5 нг/мл повт. 8	6.	120.2
Среднее значение	5.	108.5
Стандар. отклонение	0.	6.2
RSD (%)	5.	5.7
Ст.растворитель при 200 нг/мл повт. 1	238.	112.9
Ст.растворитель при 200 нг/мл повт. 2	237.	112.4
Ст.растворитель при 200 нг/мл повт. 3	231.	109.7
Ст.растворитель при 200 нг/мл повт. 4	228.	108.1
Ст.растворитель при 200 нг/мл повт. 5	244.	115.7
Ст.растворитель при 200 нг/мл повт. 6	220.	104.6
Ст.растворитель при 200 нг/мл повт. 7	229.	108.7
Ст.растворитель при 200 нг/мл повт. 8	251.	119.3
Среднее значение	235.	111.4
Стандар. отклонение	9.	4.7
RSD (%)	4.	4.2

Таблица 5. Повторяемость добавления натамицина в белое вино при двух разных концентрациях; 5 и 200 мкг/л

	Концентр. Натамицина мкг/л	**Восстановление (%)**
Белое вино 5.3 нг/мл повт.	5.3	99.1
Белое вино 5.3 нг/мл повт.	4.4	82.8
Белое вино 5.3 нг/мл повт.	5.1	96.0
Белое вино 5.3 нг/мл повт.	4.9	92.5
Белое вино 5.3 нг/мл повт.	4.6	86.4
Белое вино 5.3 нг/мл повт.	5.1	96.4
Белое вино 5.3 нг/мл повт.	4.8	90.9
Белое вино 5.3 нг/мл повт.	4.9	92.2
Среднее значение	4.9	92.0
Станд.отклонение	0.3	5.4
RSD (%)	5.9	5.9
Белое вино 211 нг/ мл повт.	217.6	103.1
Белое вино 211 нг/ мл повт.	223.3	105.8
Белое вино 211 нг/ мл повт.	213.0	101.0
Белое вино 211 нг/ мл повт.	216.8	102.7
Белое вино 211 нг/ мл повт.	211.4	100.2
Белое вино 211 нг/ мл повт.	208.6	98.9
Белое вино 211 нг/ мл повт.	204.2	96.8
Белое вино 211 нг/мл повт.	214.4	101.6
Среднее значение	213.7	101.3
Станд.отклонение	5.8	2.8
RSD (%)	2.7	2.7

Таблица 6. Повторяемость добавления натамицина в красное вино при двух концентрациях; 5 и 200 мкг/л.

	Конентр. натамицина мкг/л	**Восстановление (%)**
Красное вино 5.3 нг/мл повт. 1	5.3	99.7
Красное вино 5.3 нг/мл повт. 2	5.0	93.8
Красное вино 5.3 нг/мл повт. 3	3.8	72.5
Красное вино 5.3 нг/мл повт. 4	5.1	96.5
Красное вино 5.3 нг/мл повт. 5	5.0	95.0
Красное вино 5.3 нг/мл повт. 6	5.5	103.5
Красное вино 5.3 нг/мл повт. 7	4.3	80.9
Красное вино 5.3 нг/мл повт. 8	4.8	90.7
Среднее значение	4.9	91.6
Станд. отклонение	0.5	10.2
RSD (%)	11.1	11.1
Красное вино 211 нг/мл повт. 1	183.9	87.1
Красное вино 211 нг/мл повт. 2	178.4	84.5
Красное вино 211 нг/мл повт. 3	181.1	85.8
Красное вино 211 нг/мл повт. 4	197.5	93.6
Красное вино 211 нг/мл повт. 5	178.2	84.5
Красное вино 211 нг/мл повт. 6	184.2	87.3
Красное вино 211 нг/мл повт. 7	181.2	85.9
Красное вино 211 нг/мл повт. 8	171.3	81.2
Среднее значение	182.0	86.2
Станд. отклонение	7.5	3.6
RSD (%)	4.1	4.1

Таблица 7. Точность добавления натамицина в белое и красное вино в двух концентрациях; 125 и 220 мкг/л.

	Теоретическая концентрация (мкг/л)	**Полученная концентрация (мкг/л)**	**Точность (%)**	**Z показатель**
Белое вино А повт.1	125	135	108	0.50
Белое вино А повт. 2	125	142	114	0.85
Белое вино А повт. 3	125	138	110	0.65
Белое вино В повт. 1	220	230	105	0.28
Белое вино В повт. 2	220	230	105	0.28
Белое вино В повт. 3	220	239	109	0.54
Красное вино А	220	213	97	-0.20
Красное вино А	220	234	106	0.40
Красное вино А	220	223	101	0.09
Красное вино В	125	129	103	0.20
Красное вино В	125	129	103	0.20
Красное вино В	125	120	96	-0.25

Расчеты

Z-скор расчитывается как:

= (Полученная концентрация - Теоретическая концентрация)/ целевое стандартное отклонение

Где:

Целевое стандартное отклонение = 0.16 x пиковая концентрация, т.е. по Горвицу

2.2 Определение натамицина (пимарицина) в вине с помощью ВЭЖХ/DAD

2.2.1 Объем

Этот метод описывает процедуру проведения анализа определения натамицина (пимарицина) в вине с помощью ВЭЖХ. Уровень натамицина выражен в микрограммах на литр (мкг/л) вина.
Описанный метод был проверен в лаборатории, учитывая влияние матрицы вина (например, белое вино или красное вино).

2.2.2 Сущность метода

Образцы неигристого вина напрямую помещаются в систему ВЭЖХ. Образцы игристого вина сначала дегазируются путем фильтрации или с помощью использования ультразвуковой ванны. Аналит отделяется от матрицы на C8-колонке. Окно фракционирования с аналитом автоматически переносится на колонку C18 для дальнейшего разделения. Натамицин обнаруживается при длинах волн 304 нм и 319 нм. Дополнительно для обнаружения используется спектр DAD. Количественная оценка делается с отсылкой на внутренние стандарты.

2.2.3 Реактивы и материалы

2.2.3.1 Реактивы

2.2.3.1.1 Деионизированная вода

2.2.3.1.2 Метанол, оценка ВЭЖХ *(CAS no. 67-56-1).*

2.2.3.1.3 Муравьиная кислота, р. а. *(CAS no. 64-18-6).*

2.2.3.1.4 Уксусная кислота, р. а**.** *(CAS no. 64-19-7).*

2.2.3.1.5 Соляная кислота, р. а., 0,1 N *(CAS no. 7647-01-0).*

2.2.3.1.6 Матрица вина, натамицин не обнаруживается

2.2.3.1.7 Натамицин, > 95 % *(CAS no. 7681-93-8).*

Чистоту проверяют фотометрическим измерением при длинах волн 291 нм, 304 нм и 319 нм раствора натамицина в соляной кислоте, 0.1 N, парированием до холостого раствора с соляной кислотой:

Справочные данные согласно справочнику	291 нм	304 нм	319 нм
Коэффициент поглощения (1 % массы натамицина, 1 см ячейка)	758	1173	1070

Альтернатива:

После разбавления (к примеру, коэффициент разведения 20) основной раствор (2.1.3.3.1.) также может быть использован для фотометрического измерения, к примеру, влить 1,0 мл основного раствора в мерную колбу и заполнить до отметки соляной кислотой, 01 N. Сравнивают измерение с измерением холостого раствора с тем же составом растворителя, что и разбавленный стандартный раствор.

2.2.3.2 Подготовка мобильной фазы

2.2.3.2.1 Растворы для мобильной фазы:

2.2.3.2.1.1 5 мл уксусной кислоты, добавленной в 2 литра метанола

2.2.3.2.1.2 5 мл уксусной кислоты, добавленной в 2 литра деионизированной воды

2.2.3.2.2 Элюент 1: метанол-уксусная кислота / деионизированная вода-уксусная кислота (65 / 35)

2.2.3.2.3 Элюент 2: метанол-уксусная кислота / деионизированная вода-уксусная кислота (80 / 20)

2.2.3.3 Подготовка основного и стандартного растворов

Все растворы, имеющие ограниченную стабильность, следует хранить в темноте и холоде, в холодильнике. Основной раствор (2.1.3.3.1.1) имеет срок годности до нескольких недель, но его концентрацию следует проверять прямо перед использованием (см. пример альтернативные методы 2.2.3.1.7.). Растворы I (2.2.3.3.1.2) и II (2.2.3.3.1.3), а также стандартные растворы (2.2.3.3.2) нужно готовить ежедневно.

2.2.3.3.1 Подготовка основного и разбавленного растворов

2.2.3.3.1.1 Основной раствор (приблизительно 100 мг/л)

Взвешивают примерно 5 мг натамицина (3.1.7) и вместе с метанолом перемещают в 50 мл мерную колбу. Добавляют 0,5 мл муравьиной кислоты, убеждаются, что весь натамицин растворен, при температуре 20 °C, и доводят до метки метанолом.

2.2.3.3.1.2 Раствор I (примерно 5 мг/л)

Вливают 2,5 мл основного раствора (2.1.3.3.1.1) в 50 мл мерную колбу и доливают до отметки деионизированной водой.

2.2.3.3.1.3 Раствор II (примерно 1 мг/л)

Вливают 4 мл Раствора I (2.2.3.3.1.2) в 20 мл мерную колбу и доливают до отметки матричным вином (2.2.3.1.6).

2.2.3.3.2 Подготовка стандартных растворов

Для стандартных растворов следует разбавить раствор II (2.2.3.3.1.3) до нужных концентраций винной матрицей (2.2.3.1.6), к примеру, 50 мкл в мерной колбе на 10 мл эквивалентно 5 мкг/л:

Мерная колба	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл
Объем разбавления II (мкл)	50	100	200	400	500	1000	3700
Количество натамицина	5	10	20	40	50	100	370

2.2.4 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование, в частности:

2.2.4.1 аппарат ВЭЖХ с диодно-матричным детектором с 6-ходовым клапаном ВЭЖХ и двумя изократическими насосами или градиентным насосом для обеспечения фракционирования

2.2.4.2 ВЭЖХ -колонка RP-8

2.2.4.3 ВЭЖХ -колонка RP-18

2.2.4.4 Фотометр

2.2.5 Отбор образцов

Образцы не игристого вина, напрямую вводятся в систему ВЭЖХ. Образцы игристого вина, сперва дегазируют посредством фильтрации или, используя ультразвуковую ванну. При необходимости хранение должно проводиться в холодных и темных условиях.

2.2.6. Проведение исследования

2.2.6.1. Условия проведения исследования ВЭЖХ

Следующие колонки и параметры являются подходящими:

Колонка 1: C8-колонка (например, Merck Select B с крышкой 125*4мм/5мкм)

Мобильная фаза: Элюент 1 (2.2.3.2.2) при комнатной температуре

Скорость потока: 1 мл/мин

Колонка 2: C 18-колонка (например, Merck Lichrospher 125*4мм/5мкм)

Мобильная фаза: Элюент 2 (2.2.3.2.3) при 30°C

Скорость потока: 1 мл/мин
Объем впрыска: 500 мкл
УФ-обнаружение: 304 нм и 319 нм
Окно фракции: Положение окна фракционирования должно быть проверено перед проведением следующего анализа (рис.1). Диапазон окна фракционирования должен быть установлен на 0,5 мин до и после элюирования желаемого пика C8-колонки.

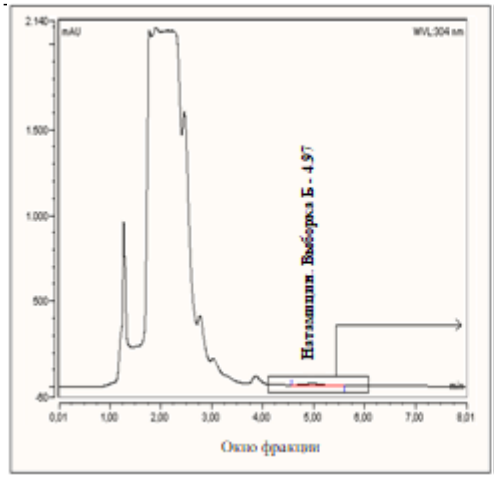


Рис. 1 Колонка 1
Окно фракции

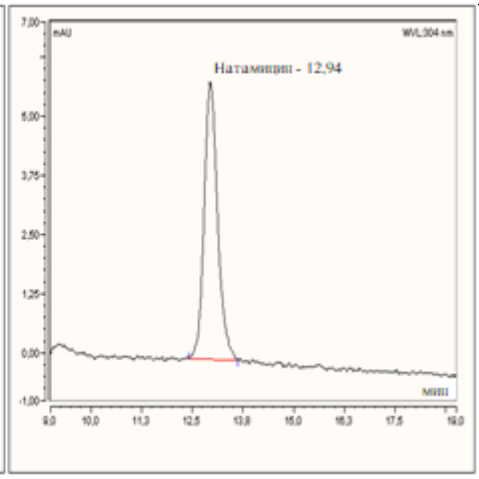


Рис. 2 Колонка 2
Белое вино с добавлением натамицина (50 мкг/л)

2.2.6.2 Идентификация/ подтверждение

Идентификация пиков осуществляется путем сравнения времени удержания стандартов и образцов измеренных при длинах волн 304 нм и 319 нм. При использовании хроматографической системы и параметров, представленными в пункте 2.2.6.1, время удержания натамицина приблизительно составляет 12,9 мин (рис. 2).
Спектр DAD используется для дальнейшего подтверждения положительных результатов (рис. 3 и рис. 4).

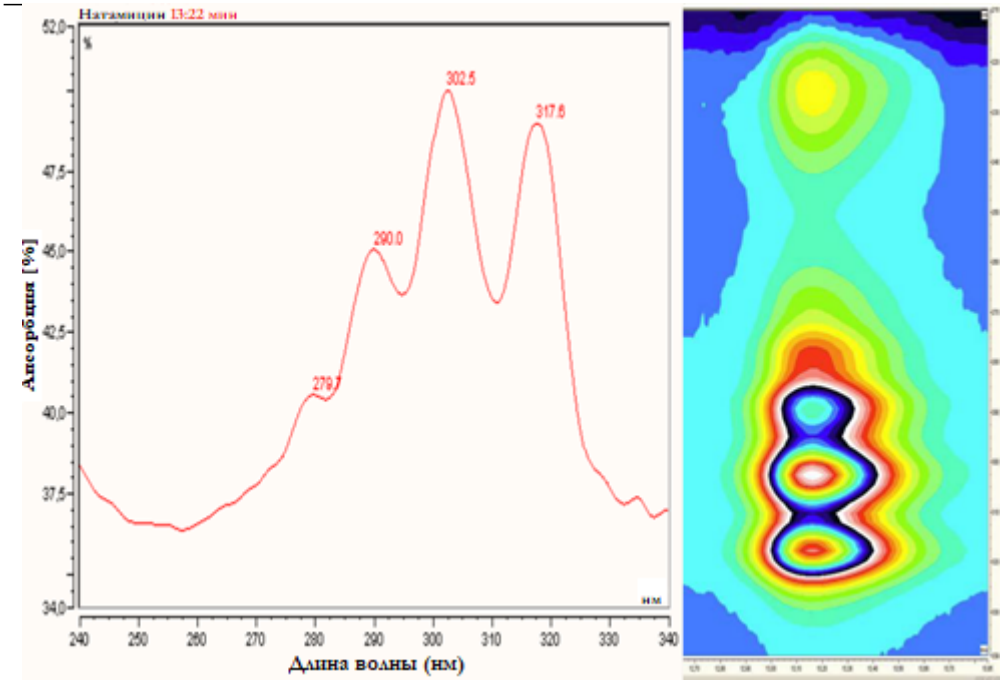


Рис. 4 DAD-спектры натамицина

Рис. 3 3D-DAD-спектры натамицина

2.2.7. Вычисление и выражение результатов

Калибровочная кривая стандартных растворов (2.2.3.3.2), подготовлена с использованием хроматограмм, измеренных при длине волны 304 нм. Количественное определение натамицина проводят по методу внешней калибровки. Линейная калибровочная кривая создается путем сравнения площадей пиков и соответствующих концентраций. Коэффициент корреляции составляет по меньшей мере 0,99.

Выражение результатов мкг/л.

2.2.8. Данные о производительности метода

Предел обнаружения, предел количественного определения

Предел обнаружения и предел количественного определения был определен согласно DIN 32645 (прямое определение: умножить измерение холостого образца матрицы , n=10, и калибровочной кривой, которая покрывает полный рабочий диапазон).
Предел обнаружения: 2,5 мкг/л

Предел количественного определения: 8,5 мкг/л

Линейность

Линейность в матрице вина подтверждена в калибровочном диапазоне от 5 мкг/л до 100 мкг/л (рис.5).

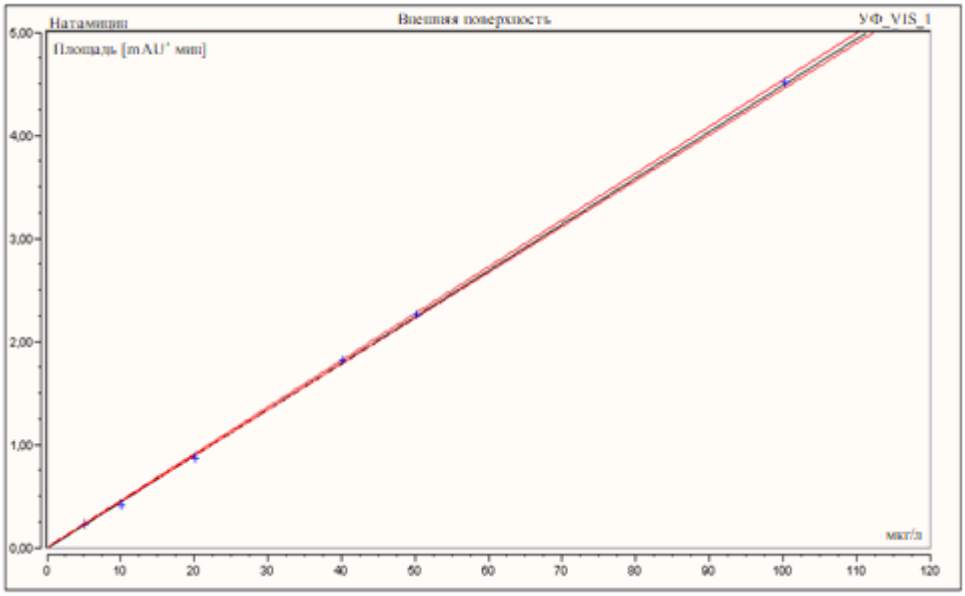


Рис. 5 Шеститочечный график калибровки натамицина, в матрице белого вина в диапазоне от 5 до 100 мкг/л, R^2= 0, 9999.

2.2.9 Точность и достоверность

Точность и воспроизводимость были оценены путем обогащения белых, розовых и красных вин известным количеством натамицина и пятикратного измерения каждого из этих образцов. Результаты представлены в Таблице 1.

Матрица	Содержание натамицина в матрице (мкг/л)	Содержание добавленного натамицина (мкг/л)	Измеренное содержание натамицина (мкг/л)	Скорость восст. (%)	Z - показтель
Белое вино	n. d.	5.02	5.04	100.4	0.0
			4.70	93.6	-0.2
			5.12	102.0	0.1
			5.29	105.4	0.2
			4.97	99.0	0.0
		Среднее значение	**5.02**	**100.1**	
		Станд.отклонение	**0.22**		
		RSD (%)	**4.3**		
		Повторяемость r	**0.85**		
Розовое вино	n. d.	5.02	4.79	95.4	-0.1
			4.83	96.2	-0.1
			4.76	94.8	-0.1
			4.79	95.4	-0.1
			4.73	94.2	-0.2
		Среднее значение	**4.78**	**95.2**	
		Станд.отклонение	**0.04**		
		RSD (%)	**0.78**		
		Повторяемость r	**0.15**		
Красное вино	n. d.	5.02	4.61	91.8	-0.2
			4.65	92.6	-0.2
			4.89	97.4	-0.1
			4.67	93.0	-0.2
			4.34	86.5	-0.4
		Среднее значение	**4.63**	**92.3**	
		Станд.отклонение	**0.20**		
		RSD (%)	**4.2**		
		Повторяемость r	**0.77**		
Красное вино	n. d.	21.2	19.73	93.1	-0.2
			20.66	97.5	-0.1
			21.16	99.8	0.0
			19.73	93.1	-0.2

			19.58	92.4	-0.3
		Среднее значение	**20.17**	**95.2**	
		Станд.отклонени	**0.70**		
		RSD (%)	**3.5**		
		Повторяемость r	**2.7**		
Красное	n	53.2	51.84	97.4	-0.1
			51.91	97.6	-0.1
			51.42	96.7	-0.1
			50.12	94.2	-0.2
			50.62	95.2	-0.2
		Среднее значение	**51.18**	**96.2**	
		Станд. отклонение	**0.78**		
		RSD (%)	**1.5**		
		Повторяемость r	**3.1**		

Таблица 1. Точность добавления натамицина в белое, розовое и красное вино; n.d. «не обнаружено», предел обнаружения 2.5 мкг/л

Вычисления (Таблица 1):

Повторяемость r = Станд. Отклонение * $t_{4;0.95}$ * $2^{1/2}$

Z показатель = (измеренное содержание натамицина - добавленное содержание натамицина)/ целевое стандартное отклонение*

* согласно Горвицу
Целевое стандартное отклонение = 1/100 * добавленное содержание * $2^{(1 - 0.5 \log \text{пиковой суммы})}$

Библиография

DIN 32645:2008-11

UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe. Editio Cantor Aulendorf. 1978. Herausgeber/ Editior Hans-Werner Dibbern in Zusammenarbeit mit E. Wirbitzki

Macarthur R. Feinberg M. Bertheau Y. 2010. Construction of measurement uncertainty profiles for quantitative analysis of genetically modified organisms based on interlaboratory validation data. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 93(3). 1046 ± 1056.

FV 1351. Dominic Roberts and Adrian Charlton. Determination of natamycin in wine by liquid chromatography coupled to high resolution mass

spectrometry: standard operating procedure and method performance data. OIV SCMA March
2010.
FV 1355. Tomasz Brzezina. Natamycin in Wein. OIV SCMA March 2010.

Метод OIV-MA-AS323-10 Методы II/IV типа

Метод определения фталатов в вине газовой хроматографией / масс-спектрометрией

OIV-OENO 477-2013
пересмотрен OIV-OENO 596-2019

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод применяется для обнаружения фталатов в винах.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Образец экстрагируется изогексаном. Концентрированный экстракт, дейтрированный внутренними стандартами, анализируется газовой хроматографией/ масс-спектрометрией (ГХ/МС).

3. РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Если не указано иное, все используемые реагенты имеют признанное аналитическое качество.

3.1 DMP (диметилфталат) [CAS N°: 131-11-3]
3.2 DnBP (дибутилфталат) [CAS N°: 84-74-2]
3.3 DEHP (бисфталат (2-этилкесилглицерин)) [CAS N°: 117-81-7]
3.4 BBP (бутилбензилфталат) [CAS N°: 85-68-7]
3.5 DINP (диизонилфталат) [CAS N°: 068515-48-0/028553-12-0]
3.6 DIDP (диизодецилфталат) [CAS N°: 068515-49-1/026761-40-0]
3.7 DCHP (дициклогексилфталат) [CAS N°: 84-61-7]
3.8 DEP (диэтилфталат) [CAS N°: 84-66-2]
3.9 DiBP (диизобутилфталат) [CAS N°: 84-74-2]
3.10 DnOP (ди-н-октилфталат) [CAS N°: 117-84-0]
3.11 DMP-d4: внутренний стандарт [CAS N°: 93951-89-4]
3.12 DEP-d4: внутренний стандарт [CAS N°: 93952-12-6]
3.13 DiBP-d4: внутренний стандарт[CAS N°: 358730-88-8]
3.14 DnBP-d4: внутренний стандарт [CAS N°: 93952-11-5]

3.15 BBP-d4: внутренний стандарт [CAS N°: 93951-88-3]
3.16 DCHP-d4: внутренний стандарт [CAS N°: 358731-25-6]
3.17 DEHP±d4: внутренний стандарт [CAS N°: 93951-87-2]
3.18 DnOP-d4: внутренний стандарт [CAS N°: 93952-13-7]
3.19 Изогексан [CAS N°: 107-83-5] и Ацетон [CAS N°: 67-64-1]

3.20 Стандартный раствор

Все мерные колбы, используемые для приготовления калибровочных растворов, следует промыть ацетоном, а затем изогексаном, чтобы избежать загрязнения.

3.20.1. Основной раствор

- Фталат - индивидуальный раствор с концентрацией 1 г/л: взвешивают по 100 мг каждого фталата в 100 мл колбе, растворяют в изогексане и довести до 100 мл.
- ДИНФ-ДИДФ - индивидуальный раствор с концентрацией 5 г/л: взвешивают по 500 мг каждого фталата в 100 мл колбе, растворяют в изогексане и довести до 100 мл.
- Внутренний стандарт - индивидуальный раствор с концентрацией 0.5 г/л: дейтрированные стандарты расфасованы в запаянные ампулы объемом 25 мг; все компоненты внутреннего стандарта переносят в мерные колбы объемом 50 мл и доливают раствор до 50 мл с помощью изогексана.

3.20.2. Рабочий раствор

- Рабочий раствор фталата с концентрацией 1 мг/л (**S1**)

  Берут по 100 мкл каждого из основных растворов с концентрацией 1 г/л и 5 г/л (3.20.1), добавляют образцы в 100 мл колбу и долить до 100 мл изогексаном.

- Рабочий раствор фталата с концентрацией 10 мг/л (**S2**)

  Берут по 1 мл каждого из основных растворов 1 г/л и 5 г/л (3.20.1), добавляют образцы в 100 мл колбу и доливают до 100 мл изогексаном.

- Стандартный рабочий раствор внутреннего стандарта с концентрацией 10 мг/л (ВС)

  Берут по 1 мл каждого основного раствора дейтрированного стандарта с концентрацией 0,5 г/л (3.20.1), образцы вносят в колбу вместимостью 50 мл и доводят до 50 мл изогексаном.

3.20.3. Диапазон калибровки

Из различных рабочих растворов (3.20.2) готовят диапазон калибровки в изогексане, непосредственно во флаконах для инъекций, предварительно прошедших термическую обработку, промытых (см. § 5.1) и высушенных под колпаком, в соответствии со следующей таблицей:

Точки для калибровки	**Концент. Фталата (мг/л)***	**Об. S1 Суррогат. раствор. (мкл)**	**Об. S2 Суррог. раствор. (мкл)**	**Об.ВС Суррог. раствор. (мкл)**	**Объем Изогексана (мкл)**
C1	0	0	0	50	1000
C2	0,05	50	0	50	950
C3	0,10	100	0	50	900
C4	0,20	200	0	50	800
C5	0,50	0	50	50	950
C6	0,80	0	80	50	920
C7	1,00	0	100	50	900

* умножается на 5 для концентраций ДИФН и ДИДФ

4. ОБОРУДОВАНИЕ

4.1 Стеклянные емкости и лабораторное оборудование:

4.1.1 50 мл и 100мл мерные колбы класса А
4.1.2 50 мл стеклянные центрифужные пробирки с пробкой
4.1.3 10 мл стеклянные тестовые пробирки с крышкой
4.1.4 Микропипетки с диапазоном переменных объемов от 25 мкл до 1,000 мкл, проверенные в соответствии с ISO 8655-6
4.1.5 Приточный испаритель азота

4.2 Аналитические весы

4.3 ГХ-МС Система (например, Varian 450GC-300MS)

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1 Меры предосторожности

Из-за присутствия фталатов в лабораторной среде, необходимо придерживаться мер предосторожности во время проведения анализа этих соединений:

- Избегать любого контакта с пластиковым оборудованием (особенно пластикат) насколько возможно. Если это невозможно, необходимо убедиться в отсутствии загрязнений.
- Протестировать используемые растворы и выделить бутылки с растворителем для этих анализов.
- Подвергнуть термообработке все объемные стеклянные сосуды (400°C не менее 2 часов). Тщательно сполоснуть все оборудование (сначала ацетоном, а потом изогексаном).
- Необходимо убедиться, что все перегородки флаконов для инъекций не содержат флататов.
- До и после каждого введения растворов, сполоснуть шприцы несколько раз.
- По возможности проводить работу в чистой комнате, подготовленной для этих анализов.

5.2 Подготовка образцов

Помещают 12.5 мл образца в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Добавляют 10 мл изогексана.

Энергично смешивают (на вортексе) не менее одной минуты.

Дают раствору сцедиться, до тех пор, пока не произойдет разделение двух фаз (30 минут в ультразвуковой ванне при 50° ускорит разделение). Отбирают 8 мл органической фазы и переносят ее в 10 мл тестовую пробирку. Выпаривают в токе азота (0.3 бар) при 35°C и избегают высыхания (предупреждение: температура не должна превышать 40°C)

Продолжают с 1 мл изогексана.
Добавляют по 50 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 0.01 г/л в каждый экстракт. Перемещают во флакон для инъекций.

ПРИМЕЧАНИЕ: для минимизирования матричного эффекта во время проведения анализа методом ГХ-МС, можно добавить защитный раствор, такой как метилундеканоат [CAS N°: 1731-86-8].

Добавляют 20 мкл этого вещества в каждый калибровочный раствор и в экстракты проб перед выпариванием в токе азота.

5.3 Холостой тест

Готовят «холостой» тест согласно следующей процедуре, описанной в пункте 5.2 без добавления образца.

5.4 ГХ/МС анализ

В зависимости от имеющегося оборудования и его производительности, выбирают режимы SIM и MRM для проведения масс-спектрометрии. Для информационных целей условия анализа обозначены в Приложении I, а типичная хроматограмма обозначена в Приложении II.

5.4.1 Калибровка

Сперва вводят несколько инъекций растворителя (не менее 2). Далее, вводят стандартные растворы (3.20.3) в двух экземплярах, в порядке возрастания концентрации, и заканчивают минимум двумя впрысками растворителя.

Установить калибровочную кривую для каждого фталата:
$(A_{аналит}/A_{IS}) = f(C_{аналит}/C_{IS})$.

A: площадь пика

C: концентрация

IS: внутренний стандарт

Каждый фталат количественно определяют с использованием соответствующего дейтрированного стандарта, за исключением ДИНФ и ДИДФ, которые количественно определяют с помощью DnOP-d4.

5.4.2 Анализ образцов

Запускают последовательность анализа, проанализировав холостой тест (5.3).
Затем вводят подготовленные образцы (5.2) в двух экземплярах.
Составляют план введения инъекций растворителя после потенциально загрязненных образцов.

Заканчивают серию, введя одну или несколько точек диапазона, чтобы проверить любое смещение сигнала во время проведения серии анализов, и чтобы проверить несколько впрысков растворителя.

Для каждой инъекции измеряют площадь идентифицированных пиков и внутренних стандартов, и используют уравнение для калибровочной кривой (5.4.1), чтобы определить концентрацию в анализируемом экстракте.

5.4.3 Выражение результатов

Для образца вычисляют среднее значение результатов (5.4.2) для обеих инъекций.
Результаты выражены в мг/л.

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Во время проведения каждой серии анализов, проводится контроль качества, с помощью анализа образцов вина, дополненного фталатами с концентрацией 0.020 мг/л.
Экстракт пробы, приготовленной согласно пункту 5.2, анализируют в начале серии, и полученные результаты, выраженные в единицах степени извлечения, отражаются на контрольной карте.

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Анализы проставленные в лаборатории, в условиях повторяемости и промежуточной точности, на красном и белом вине с

добавлением фталатов при двух уровнях концентрации (0.040 мг/л и 0.080 мг/л), дали следующую повторяемость (CV_r%), промежуточную воспроизводимость (CV_{IP}%), и значения восстановления:

Фталаты	Восстан. %	CVr%	CVIP%
DMP (Диметил фталат)	67	5	8
DEP (диэтилфталат)	84	8	11
DiBP (диизобутилфталат)	93	7	10
DnBP (дибутилфталат)	95	5	7
BBP (бутилбензинфталат)	98	5	6
DCHP (дициклогексилфталат)	97	5	7
DEHP (бис(2-этилгексилглицерин) фталат)	98	6	7
DnOP (диокрилфталат)	98	6	7
ДИНФ (диизонилфталат)	104	7	8
ДИДФ (диизодецилфталат)	96	8	11

т.е. следующие средние значения для всех фталатов:

Повторяемость (дана в CV_r%): **6%**
Промежуточная точность (дана в CV_{IP}%):**8%**

8. ПРЕДЕЛЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для каждого фталата, который должен быть проанализирован, обнаружение и количественное определение пределов, приведены в следующей таблице:

Фталаты	Предел кол. определения (мг/л)	Предел обнар. (мг/л)
DMP (диметил фталат)	0.010	0.004
DEP (диэтилфталат)	0.010	0.004
DiBP (диизобутилфталат)	0.010	0.004
DnBP (дибутилфталат)	0.010	0.004
BBP (бутилбензил фталат)	0.010	0.004
DCHP (дициклогекси лфталат)	0.010	0.004
DEHP (бис (2-этилгексил) фталат)	0.010	0.004
DnOP (диоктилфталат)	0.010	0.004
ДИНФ (диизононилфталат)	0.050	0.020
ДИДФ (диизодецилфталат)	0.050	0.020

9. БИБЛОГРАФЯ

FV 1371. Определение и анализ фталатов. 2011
FV 1234. Вопросы о фталатах. 2006

ПРИЛОЖЕНИЕ I

(для информации)

Условия газовой хроматографии

VF-5мс тип капиллярной колонки: 30 м x 0.25 мм внутренний диаметр, толщина пленки 0.25 мкм

Температурное программирование:

Для определения в SIM режиме:

Печь поддерживается при температуре 100°C, на протяжении 1 мин; увеличивают до 230°C при показателях 10°C/мин; увеличивают до 270°C при показателях 10°C/мин; выдерживают 2 мин, увеличивают до 300°C при показателях 25°C/мин; выдерживают 8 мин.

Примечание: это программирование позволяет разделить пики DEHP и DCHP (которые не могут быть выполнены в программном режиме MRM)

Для определения в режиме MRM:

Печь, поддерживающая температуру при 80°C на протяжении 1 мин., увеличивают до 200°C при показателях 20°C/мин;
увеличивают до 300°C при показателях 10°C/мин; поддерживают 8 мин.

Инжектор: поддерживающий 150°C на протяжении 0.5 мин; увеличивают до 280°C при показателях 200°C/мин, в безраздельном режиме при впрыске

Гелий: 1 мл/мин при постоянном потоке

Введенный объем: 1 мкл

Условия масс-спектрометрии (МС)

Ионизация в режиме EI при 70 eV
Температура источника: 250°C
Температура линии передач: 300°C
Гребёнка: 40°C

Параметры количественного определения и идентификации фталатов

В таблице 1 указаны, в случае анализа в режиме SIM, ион количественного определения и два идентификационных иона для каждого фталата и его дейтерированного аналога.

Для проведения анализа в режиме MRM, таблица 2 отражает количественные и качественные переходы для каждого фталата и его дейтерированного аналога.

Примечание: DIDP и DINP представляют собой смесь соединений. Хроматография не может обеспечить их полное сепарирование. Поэтому они анализируются как "группа".

ПРИЛОЖЕНИЕ I

(для информации) Таблица 1

		Колич. ион m/z	Ионы-квалифик.m/z	
DMP	(диметил фталат)	163	77	194
DMP-d4		167	81	198
DEP	(диэтил фталат)	149	177	222
DEP-d4		153	181	226
DiBP	(диизобутил фталат)	149	167	223
DiBP-d4		153	171	227
DnBP	(дибутил фталат)	149	205	223
DnBP-d4		153	209	227
BBP	(бутилбензилфталат)	149	91	206
BBP-d4		153	95	210
DCHP	(дициклогексил фталат	149	167	249
DCHP-d4		153	171	253
DEHP	(бис(2-этилгексилглицерин) фталат)	149	167	279
DEHP-d4		153	171	283
DnOP	(диоктил фталат)	149	167	279
DnOP-d4		153	171	283
DINP	(диизононил фталат)	149	293	
DIDP	(диизодецил фталат)	149	307	

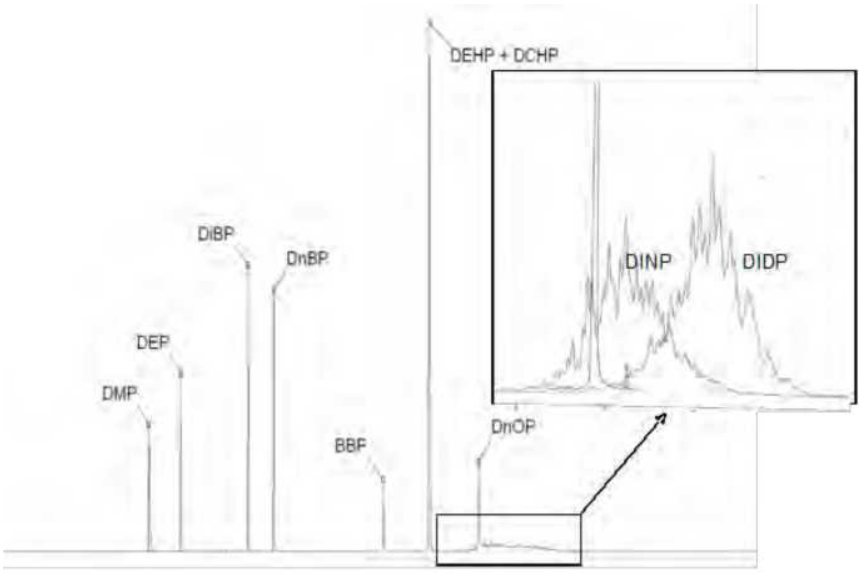
Таблица 2

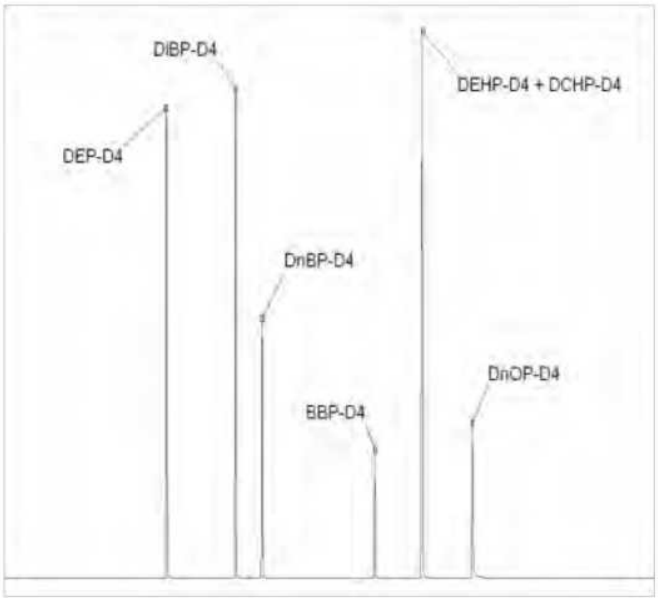
		Колич.переход	Квалиф.переход
DMP	(диметил фталат)	194>163	194>77
DMP-d4		198>167	198>81
DEP	(диэтилфталат)	177>149	177>93
DEP-d4		181>153	181>97
DiBP	(диизобутилфталат)	223>149	205>149
DiBP-d4		227>153	209>153
DnBP	(дибутил фталат)	223>149	205>149
DnBP-d4		227>153	209>153
BBP	(бутилбензолфталат)	206>149	149>121
BBP-d4		210>153	153>125
DCHP	(дициклогексил фталат)	249>149	249>93
DCHP-d4		253>153	253>97
DEHP	(бис(2-этилгексилглицерин)фталат)	279>149	279>93
DEHP-d4		283>153	283>97
DnOP	(диоктилфталат)	279>149	279>93
DnOP-d4		283>153	283>93
DINP	(диизононил фталат)	293>149	
DIDP	(диизодецил фталат)	307>149	

ПРИЛОЖЕНИЕ II

(для информации)

ГХ/МС хроматограммы стандартного раствора фталата и дейтерированных внутренних стандартов.


DEHP + DCHP
DiBP
DnBP
DEP
DMP
BBP
DnOP
DINP
DIDP


DiBP-D4
DEHP-D4 + DCHP-D4
DEP-D4
DnBP-D4
DnOP-D4
BBP-D4

ПРИЛОЖЕНИЕ III
(для информации)

ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИЗА ФТАЛАТОВ В ВИНАХ

1. Резюме

Институт Эталонных Материалов и Измерений (IRMM), организовал в тесном сотрудничестве с международной организацией виноградарства и виноделия (МОВВ) это совместное исследование для проверки метода OIV-MA-AS323-10:2013, для определения десяти фталатов в вине с помощью газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС).
Концепция данного исследования эффективности метода соответствует положениям стандарта ISO 5725-2 и положениям МОВВ. Тестовые образцы состоящие из красного вина, белого вина и сладкого вина, представлены как слепые дубликаты (см.Таблицу 1).
Вина были дополнены на IRMM, разлиты в ампулы, и отосланы участникам валидационного исследования.
В дополнение к тестовым образцам участники получили раствор дейтерированных фталатов, чтобы иметь возможность приготовить растворы внутреннего стандарта.

Участники исследования были определены МОВВ в ходе следующего предварительного исследования метода. В их состав вошли лаборатории из Европы, Азии, Южной Америки и Австралии (см. Таблица 2).
Оценка отчетных результатов проводилась в соответствии со стандартами ISO 5725-2 и ISO 5725-4, а также в соответствии с положениями, установленными в МОВВ. Относительные стандартные отклонения воспроизводимости были в основном в пределах диапазона от 9% до 71%.

Таблица 1

Образец	S001	S002	S003	S004	S005	S006
Тип	Белое вино		Красное		Сладкое вино	

2. Участники исследования

Таблица 2: Участники исследования

Analab Chile S.A.	Чили
Animal & Plant & Food Inspection Centre, Tianjin Exit- Entry Inspection and Quarantine	Народная Китайская Республика
Bureau Interprofessionnel du Cognac	Франция
Central National de Verificare a Calitatii Productiei Alcoolice	Республика Мордова
Chemisches und Veterinaeruntersuchungsamt Stuttgart	Германия
Escola Superior de Biotecnologia Universidade Católica Portuguesa	Португалия
Instituto Nacional de Vitivinicultura Departamento de Normas Analiticas Especiales	Аргентина
Лаборатория Arbitral Agroalimentario	Испания
Лаборатория DUBERNET	Франция
Miguel Torres S.A.	Испания
SAILab	Испания
SCL Laboratoire de Bordeaux	Франция
SCL Laboratoire de Montpellier	Франция
The Australian Wine Research Institute	Австралия

3. Оценка представленных результатов

Было оценено удобство использования рассчитанных стандартных отклонений воспроизводимости. Для этой цели 1 расчетное стандартное отклонение относительной воспроизводимости (RSD_R) сравнивали с относительным стандартным отклонением, полученным на основе модифицированного уравнения Горвица (RSD_{mH}), как было предложено Томпсоном (Thompson 2000). Оно обеспечивает ориентировочный уровень воспроизводимости в зависимости от концентрации. Согласие с рекомендуемым уровнем прецизионности выражали значения воспроизводимости по Горрату($ГОРРАТ_R$).

4. Оценка систематических эффектов

Организаторы связались с лабораториями, сообщившими о результатах, которые превышают 1%-порог, для одного или нескольких аналитов, как на уровне статистики Манделя h, так и Манделя k, чтобы проверить предоставленные данные и подтвердить их. Результаты исключались из оценки данных, если лаборатория не подтверждала точность представленных лабораторных результатов.

5. Оценка результатов по аналиту

Основанный на результатах отдельных анализов каждого аналита, и в зависимости от результатов их воспроизводимости метод следует отнести к типу II (DCHP BBP DBP DIBP DEP) или типу IV (DIDP DINP DNOP DEHP DMP).

Таблица 3: Диметилфталат (DMP)[1] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		11	10	11	10	10	11
Среднее значение	мг/л	0.020	0.073	0.018	0.031	0.053	0.027
Медиана	мг/л	0.020	0.060	0.018	0.030	0.056	0.028
Присвоенное значение	мг/л	0.030	0.097	0.030	0.049	0.104	0.046
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-33.3%	-38.1%	-40.0%	-38.8%	-46.2%	-39.1%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.003	0.007	0.002	0.006	0.011	0.003
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.006	0.041	0.007	0.011	0.022	0.009
Отн. Повторяемость s.d.		9.42%	7.33%	8.04%	13.00%	10.25%	7.09%
Отн. Воспроизводимость s.d.		20.10%	42.40%	23.12%	22.54%	21.10%	19.07%
Модиф. Horwitz s.d.**		22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%
$HORRAT_R$		0.91	1.93	1.05	1.02	0.96	0.87
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.008	0.020	0.007	0.018	0.030	0.009
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг/л	0.017	0.114	0.019	0.031	0.061	0.024
Предел повторяемости		26.09%	20.32%	22.28%	36.00%	28.38%	19.64%
Предел воспроизводимости		55.67%	117.45%	64.05%	62.44%	58.45%	52.84%
No. лабораторий после исключения выбросов		9	9	8	8	9	10
Количество измерений без выбросов		18	18	15	16	18	20

[1] Метод IV типа

Таблица 4: Диэтилфталат (DEP)[2] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		12	11	11	11	10	12
Среднее значение	мг/л	0.048	0.065	0.030	0.039	0.021	0.059
Медиана	мг/л	0.044	0.076	0.029	0.041	0.023	0.061
Присвоенное значение	мг/л	0.057	0.092	0.031	0.056	0.030	0.089
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-22.8%	-17.4%	-6.5%	-26.8%	-23.3%	-31.5%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.006	0.010	0.005	0.004	0.003	0.002
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.026	0.026	0.015	0.017	0.008	0.019
Повторяемость s.d.		10.49%	11.32%	15.28%	7.00%	11.41%	2.53%
Воспроизводимость s.d.		45.36%	28.49%	47.95%	29.71%	25.74%	20.98%
Модиф. Horwitz s.d. **		22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%
$HORRAT_R$		2.06	1.30	2.18	1.35	1.17	0.95
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.017	0.029	0.013	0.011	0.009	0.006
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг/л	0.072	0.073	0.041	0.046	0.021	0.052
Предел повторяемости		29.05%	31.35%	42.32%	19.40%	31.60%	7.01%
Предел воспроизводимости		125.66%	78.91%	132.81%	82.29%	71.30%	58.12%
No. лабораторий после исключения		11	10	11	9	10	11
Количество измерений без выбросов		21	20	21	17	20	22

2 Метод II типа

Таблица 5: Диизобутилфталат (DIBP)[3] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие		11	10	11	10	10	11
Среднее значение	мг/л	0.049	0.087	0.076	0.119	0.054	0.046
Медиана	мг/л	0.049	0.085	0.076	0.123	0.055	0.045
Присвоенное значение	мг/л	0.035	0.076	0.058	0.107	0.061	0.045
Присвоенное значение относительного ст.знач.		40.0%	11.8%	31.0%	15.0%	-9.8%	0.0%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.003	0.006	0.007	0.009	0.002	0.004
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.011	0.019	0.014	0.023	0.012	0.013
Повторяемость s.d.		7.43%	7.71%	11.55%	8.81%	4.04%	9.54%
Воспроизводимость s.d.		32.18%	25.23%	24.48%	21.95%	19.98%	28.37%
Модиф. Horwitz s.d. **		22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%
$HORRAT_R$		1.46	1.15	1.11	1.00	0.91	1.29
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.007	0.016	0.019	0.026	0.007	0.012
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг/л	0.031	0.053	0.039	0.065	0.034	0.035
Предел повторяемости		20.58%	21.35%	31.98%	24.42%	11.19%	26.44%
Предел воспроизводимости		89.15%	69.88%	67.80%	60.81%	55.35%	78.58%
No. лабораторий после исключения		11	10	11	10	10	11
Количество измерений без выбросов		21	20	21	20	20	22

[3] Метод II типа

Таблица 6: Дибутилфталат (DBP)[4] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		12	11	12	11	11	12
Среднее значение	мг/л	0.103	0.264	0.078	0.728	0.090	0.178
Медиана	мг/л	0.103	0.266	0.074	0.666	0.089	0.174
Присвоенное значение	мг/л	0.107	0.281	0.057	1.039	0.032	0.153
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-3.7%	-5.3%	29.8%	-35.9%		
Повторяемость s.d.	мг/л	0.009	0.014	0.011	0.033	0.004	0.012
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.022	0.048	0.021	0.314	0.018	0.022
Повторяемость s.d.		8.24%	5.03%	19.11%	3.21%	13.79%	7.87%
Воспроизводимость s.d.		20.73%	17.01%	36.78%	30.25%	57.05%	14.66%
Модиф. Horwitz s.d. **		22.00%	19.36%	22.00%	15.91%	22.00%	21.22%
$HORRAT_R$		0.94	0.88	1.67	1.90	2.59	0.69
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.024	0.039	0.030	0.092	0.012	0.033
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг/л	0.061	0.132	0.058	0.871	0.051	0.062
Предел повторяемости		22.81%	13.92%	52.94%	8.89%	38.21%	21.80%
Предел воспроизводимости		57.43%	47.12%	101.88%	83.79%	158.03%	40.60%
No. лабораторий после исключения выбросов		12	11	12	10	11	11
Количество измерений без выбросов		23	22	23	20	22	22

4 Метод II типа

Таблица 7: Бензилбутилфталат (BBP)[5] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		11	10	11	10	10	11
Среднее значение	мг/л	0.049	0.026	0.033	0.074	0.075	0.050
Медиана	мг/л	0.050	0.027	0.034	0.075	0.078	0.051
Присвоенное значение	мг/л	0.057	0.029	0.037	0.088	0.087	0.053
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-12.3%	-6.9%	-8.1%	-14.8%	-10.3%	-3.8%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.002	0.001	0.003	0.004	0.003	0.003
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.008	0.004	0.005	0.011	0.015	0.007
Повторяемость s.d.		4.30%	4.96%	8.08%	5.10%	3.31%	4.78%
Воспроизводимость s.d.		13.71%	13.82%	13.93%	12.72%	17.00%	14.00%
Модиф. Horwitz s.d. **		22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%
$HORRAT_R$		0.62	0.63	0.63	0.58	0.77	0.64
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.007	0.004	0.008	0.012	0.008	0.007
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг/л	0.022	0.011	0.014	0.031	0.041	0.021
Предел повторяемости		11.90%	13.75%	22.38%	14.14%	9.16%	13.23%
Предел воспроизводимости		37.98%	38.27%	38.58%	35.23%	47.09%	38.77%
No. лабораторий после исключения выбросов		9	8	10	9	9	10
Количество измерений без выбросов		17	15	19	18	18	20

5 Метод II типа

Таблица 8: Дициклогексилфталат (DCHP)[6] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		9	8	9	8	8	9
Среднее значение	мг/л	0.079	0.042	0.030	0.088	0.046	0.031
Медиана	мг/л	0.076	0.044	0.033	0.091	0.050	0.033
Присвоенное значение	мг/л	0.084	0.048	0.038	0.105	0.057	0.036
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-9.5%	-8.3%	-13.2%	-13.3%	-12.3%	-8.3%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.005	0.006	0.003	0.005	0.002	0.001
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.024	0.008	0.005	0.011	0.011	0.006
Повторяемость s.d.		5.60%	13.13%	6.75%	4.84%	3.25%	3.67%
Воспроизводимость s.d.		28.46%	16.05%	12.93%	10.20%	18.83%	16.37%
Модиф. Horwitz s.d. **		22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%
$HORRAT_R$		1.29	0.73	0.59	0.46	0.86	0.74
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.013	0.017	0.007	0.014	0.005	0.004
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг/л	0.066	0.021	0.014	0.030	0.030	0.016
Предел повторяемости		15.53%	36.37%	18.69%	13.40%	9.00%	10.18%
Предел воспроизводимости		78.83%	44.46%	35.82%	28.24%	52.15%	45.35%
No. лабораторий после исключения выбросов		9	7	8	7	7	8
Количество измерений без выбросов		18	14	15	14	14	16

6 Метод II типа

Таблица 9: Бис (2-этилгексил)фталат (DEHP)[7] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		12	11	12	11	11	12
Среднее значение	мг/л	0.101	0.028	0.602	0.150	0.741	1.032
Медиана	мг/л	0.099	0.026	0.654	0.180	0.709	1.115
Присвоенное значение	мг/л	0.217	0.046	1.049	0.328	1.569	2.013
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-54.4%	-43.5%	-37.7%	-45.1%	-54.8%	-44.6%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.017	0.005	0.206	0.016	0.122	0.266
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.019	0.011	0.238	0.063	0.465	0.563
Повторяемость s.d.		7.72%	11.54%	19.66%	4.82%	7.78%	13.20%
Воспроизводимость s.d.		8.92%	24.15%	22.70%	19.11%	29.61%	27.96%
Модиф. Horwitz s.d. **		20.13%	22.00%	15.88%	18.92%	14.95%	14.40%
$HORRAT_R$		0.44	1.10	1.43	1.01	1.98	1.94
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.046	0.015	0.571	0.044	0.338	0.736
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг/л	0.054	0.031	0.660	0.174	1.287	1.559
Предел повторяемости		21.39%	31.98%	54.45%	13.36%	21.54%	36.55%
Предел воспроизводимости		24.70%	66.91%	62.87%	52.93%	82.03%	77.46%
No. лабораторий после исключения выбросов		10	10	12	9	11	12
Количество измерений без выбросов		20	20	23	18	22	24

[7] Метод IV типа

Таблица 10: Ди-н-октилфталат (DNOP)[8] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		11	10	11	10	9	10
Среднее значение	мг/л	0.031	0.015	0.051	0.073	0.016	0.026
Медиана	мг/л	0.035	0.015	0.049	0.061	0.019	0.028
Присвоенное значение	мг/л	0.086	0.031	0.059	0.114	0.036	0.054
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-59.3%	-51.6%	-16.9%	-46.5%	-47.2%	-48.1%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.007	0.003	0.021	0.005	0.004	0.005
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.010	0.003	0.023	0.038	0.008	0.011
Повторяемость s.d.		7.84%	9.25%	36.33%	4.51%	11.18%	9.23%
Воспроизводимость s.d.		11.50%	9.33%	38.90%	33.40%	23.32%	20.10%
Модиф. Horwitz s.d. **		22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%	22.00%
$HORRAT_R$		0.52	0.42	1.77	1.52	1.06	0.91
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.019	0.008	0.059	0.014	0.011	0.014
Предел воспроизводимости, R	мг/л	0.027	0.008	0.064	0.105	0.023	0.030
Предел повторяемости		21.73%	25.61%	100.62%	12.50%	30.97%	25.56%
Предел воспроизводимости		31.85%	25.85%	107.76%	92.52%	64.60%	55.66%
No. лабораторий после исключения выбросов		9	8	10	9	7	8
Количество измерений без выбросов		18	15	18	16	14	16

8 Метод IV типа

Таблица 11: Диизононилфталат (ДИНФ)[9] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		9	8	10	8	8	9
Среднее значение	мг/л	0.027	0.108	1.820	0.059	0.115	0.064
Медиана	мг/л	0.028	0.116	1.497	0.058	0.136	0.051
Присвоенное значение	мг/л	0.054	0.242	3.134	0.104	0.271	0.057
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-48.1%	-52.1%	-52.2%	-44.2%	-49.8%	-10.5%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.004	0.019	0.520	0.005	0.010	0.003
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.006	0.027	1.067	0.019	0.072	0.040
Повторяемость s.d.		8.14%	7.84%	16.60%	5.17%	3.83%	5.51%
Воспроизводимость s.d.		10.27%	11.18%	34.06%	18.41%	26.60%	70.59%
Модиф. Horwitz s.d. **		20.00%	20.00%	20.00%	20.00%	20.00%	20.00%
$HORRAT_R$		0.51	0.56	1.70	0.92	1.33	3.53
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.012	0.053	1.441	0.015	0.029	0.009
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг/л	0.015	0.075	2.957	0.053	0.200	0.111
Предел повторяемости		22.55%	21.71%	45.99%	14.32%	10.61%	15.27%
Предел воспроизводимости		28.44%	30.98%	94.35%	50.99%	73.69%	195.53%
No. лабораторий после исключения выбросов		5	6	9	7	6	6
Количество измерений без выбросов		10	11	17	13	12	12

9 Метод IV типа

Таблица 12: Диизодецилфталат (ДИДФ)[10] ± Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
No. лабораторий, представивших соответствующие результаты		8	7	8	7	7	8
Среднее значение	мг/л	0.096	0.103	0.677	0.152	0.186	1.828
Медиана	мг/л	0.102	0.107	0.540	0.152	0.181	1.660
Присвоенное значение	мг/л	0.275	0.186	0.200	0.281	0.427	3.070
Присвоенное значение относительного ст.знач.		-62.9%	-42.5%	170.0%	-45.9%	-57.6%	-45.9%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.009	0.018	0.477	0.048	0.027	0.202
Воспроизводимость s.d.	мг/л	0.025	0.018	0.505	0.058	0.109	1.676
Повторяемость s.d.		3.42%	9.61%	238.49%	17.11%	6.27%	6.57%
Воспроизводимость s.d.		9.11%	9.61%	252.34%	20.51%	25.43%	54.59%
Модиф Horwitz s.d. **		20.00%	20.00%	20.38%	20.00%	20.00%	20.00%
$HORRAT_R$		0.46	0.48	12.38	1.03	1.27	2.73
Предел повтор., r (2.77 X sr)	мг/л	0.026	0.050	1.321	0.133	0.074	0.559
Предел воспроизводимости, R	мг/л	0.069	0.050	1.398	0.160	0.301	4.642
Предел повторяемости		9.46%	26.62%	660.61%	47.40%	17.37%	18.21%
Предел воспроизводимости		25.25%	26.62%	698.98%	56.82%	70.44%	151.21%
No. лабораторий после исключения выбросов		7	5	7	7	7	7
Количество измерений без выбросов		14	10	13	14	14	14

10 Метод IV типа

Таблица 12: Диизодецилфталат (ДИДФ)[10] - Результаты оценки данных

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Число лабораторий, представивших результаты, соответствующие установленным требованиям		8	7	8	7	7	8
Среднее значение	мг /л	0.096	0.103	0.677	0.152	0.186	1.828
Медиана	мг /л	0.102	0.107	0.540	0.152	0.181	1.660
Присвоенное значение	мг /л	0.275	0.186	0.200	0.281	0.427	3.070
Относит. отклон. назнач. знач.		-62.9%	-42.5%	170.0%	-45.9%	-57.6%	-45.9%
Повторяемость s.d.	мг/л	0.009	0.018	0.477	0.048	0.027	0.202
Воспроизводимость s.d.	мг /л	0.025	0.018	0.505	0.058	0.109	1.676
Относительная воспроизводимость s.d.		3.42%	9.61%	238.49%	17.11%	6.27%	6.57%
Относительная воспроизводимостьs.d.		9.11%	9.61%	252.34%	20.51%	25.43%	54.59%
Измененная Horwitz s.d. **		20.00%	20.00%	20.38%	20.00%	20.00%	20.00%
$Horrat_R$		0.46	0.48	12.38	1.03	1.27	2.73
Предел повторяемости, r (2.77 X sr)	мг /л	0.026	0.050	1.321	0.133	0.074	0.559
Предел воспроизводимости, R (2.77 X sR)	мг /л	0.069	0.050	1.398	0.160	0.301	4.642
Относительный предел повторяемости		9.46%	26.62%	660.61%	47.40%	17.37%	18.21%
Относительный предел воспроизводимости		25.25%	26.62%	698.98%	56.82%	70.44%	151.21%
Число лабораторий после исключения отклонений		7	5	7	7	7	7
Количество значений измерений без отклонений		14	10	13	14	14	14

11 Тип метода: IV

6. ББЛИОГРАФИЯ

Отчет об исследовании эффективности метода определения фталатов в вине. Определение десяти фталатов в вине методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС), Венцль Томас, Карасек Любомир, Гири Анупам. Бюро публикаций Европейского союза 2015 doi :10.2787/666948 (онлайн)https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/b3ebef67-f1db-4fb2-97ce-bfc301c8ce68/language-en

12 Тип метода: IV

Метод OIV-MA-AS323-11 Тип метода: IV

Метод определения полиаспартата калия в вине с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с флуоресцентным детектором

OIV-OENO 619-2019

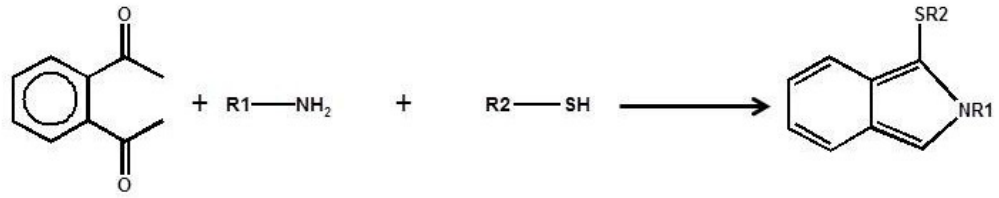
1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данный метод применим для анализа полиаспартата калия (KPA) в винах при концентрации выше 40 мг/л.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Процедура заключается в определении содержания аспарагиновой кислоты в вине до и после кислотного гидролиза путем дериватизации орто-фталальдегидом (OPA) с последующим хроматографическим анализом в сочетании с флуоресцентным детектором.

Разница в содержании аспарагиновой кислоты между гидролизованным и не гидролизованным образцом будет указывать на уровень добавления полиаспартата.



Орто-фталальдегид (OPA) Производные аминокислоты R1-NH2:

аспарагиновая кислота

R2-SH: Меркаптоэтанол

3. РЕАГЕНТЫ И ПРОДУКТЫ

Используют сверхчистую воду (EN ISO 3696 класс 3 или бидистиллированную воду).

Для кислотного гидролиза:

3.1. 10 г/л раствор метабисульфита натрия ($Na_2S_2O_5$, CAS №: 7681-57-4): взвешивают 5 гр метабисульфита натрия в 500-мл колбе класса А и доводят до метки сверхчистой водой.
3.2. 6 М соляная кислота (HCl, CAS №: 7647-01-0).
3.3. 5 М гидроксид натрия (NaOH, CAS №: 1310-73-2)

Стандартные растворы:

3.4. Аспарагиновая кислота (DL-аспарагиновая кислота $C_4H_7NO_4$, чистота - 99%, CAS №: 617-45-8)

3.4.1. Исходный раствор 1: раствор 8000 мг/л аспарагиновой кислоты в сверхчистой воде.

3.4.2. Исходный раствор 2: раствор 200 мг/л аспарагиновой кислоты в сверхчистой воде

3.5. Аминокапроновая кислота ($C_6H_{13}NO_2$, чистота - 99%, CAS №: 60-32-2)

3.5.1. Стоковый раствор аминокапроновой кислоты в концентрации 1000 мг/л в сверхчистой воде (внутренний стандарт)

Калибровочные растворы готовятся путем разбавления исходных растворов 1 и 2 в дистиллированной воде. Эталонные значения, следующие:

- 2 мг/л STD1: 0,200 мл исходного раствора 2 (3.4.2.) переносят мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем сверхчистой водой до метки

- 10 мг/л STD2: 1,000 мл исходного раствора 2 (3.4.2.) переносят мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем сверхчистой водой до метки

- 50 мг/л STD3: 5.000 мл исходного раствора 2 (3.4.2.) переносят мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем сверхчистой водой до метки

- 100 мг/л STD4: 0,250 мл исходного раствора 1 (3.4.1.) переносят мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем сверхчистой водой до метки

- 250 мг/л STD5: 0,625 мл исходного раствора 1 (3.4.1.) переносят мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем сверхчистой водой до метки

- 500 мг/л STD6: 1,250 мл исходного раствора 1 (3.4.1.) переносят мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем сверхчистой водой до метки

Дериватизирующий раствор:

3.6. Тетраборат натрия декагидрат (твердое вещество, чистота> 99%, CAS № 1303–96–4)

3.6.1. 0,1 М буферный раствор тетрабората натрия декагидрата с pH 10,5: Растворяют 19,1 г тетрабората натрия, сверхчистой водой доводят до метки в колбе вместимостью 500 мл. Проверяют значение pH.

3.7. Орто-фталальдегид (OPA) ($C_8H_6O_2$, чистота ≥ 99%, CAS №: 643-79-8)
3.8. Меркаптоэтанол (C_2H_6OS, чистота ≥ 99%, CAS No.: 60-24-2)
3.9. Дериватизирующий раствор: добавляют 100 мг орто-фталальдегид, 200 мкл меркаптоэтанола и 1 мл метанола в 10 мл колбу и доводят до метки 0,1 М буферным раствором тетрабората натрия декагидрата с pH 10,5. Раствор должен быть приготовлен непосредственно перед использованием.

Подвижные фазы ВЭЖХ:
3.10. Метанол для ВЭЖХ (жидкий)
3.11. Тетрагидрофуран для ВЭЖХ (жидкость)
3.12. Ацетат натрия безводный (CAS №: 127-09-3)
3.12.1. 0,05 М буферный раствор ацетата натрия: растворяют 2,05 г безводного ацетата натрия и сверхчистой водой доводят до метки в мерной колбе вместимостью 500 мл.
3.13. Ацетонитрил для ВЭЖХ (CH_3CN) (жидкость)
3.14. Сверхчистая вода (например, EN ISO3696 Grade 3 или дважды дистиллированная вода).
3.15. Подвижная фаза:
- [элюент A]: сверхчистая вода,
- [элюент B]: 0,05 М буферный раствор ацетата натрия/тетрагидрофурана (96:4),
- [элюент C]: метанол,
- [элюент D]: ацетонитрил.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И ПРИБОРЫ

Если не указано иное, стеклянная посуда, необходимая для приготовления растворов, должна быть класса A.
4.1. Горячая плита
4.2. Пробирка из тонированного стекла объемом 4 мл с завинчивающейся крышкой
4.3. Микропипетка 0,100-1,000 мл
4.4. Шприцевой фильтр из целлюлозно-ацетатной мембраны с пористостью 0,20 мкм
4.5. Прецизионные весы
4.6. Мерные колбы
4.7. Система ВЭЖХ, включающая насос для четырёхкомпонентных смесей, автоматический пробоотборник, отсек с термостатом для колонки и флуоресцентный детектор (ФЛД)

4.8. Колонка: полярная концевая C18 (например, Syncronis aQ4,6 x 250 мм; 5 мкм)

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Процедура делится на три этапа: горячий кислотный гидролиз образца вина; процесс подготовки образцов (как калибровочных растворов, так и вин до и после гидролиза), которые анализируются методом ВЭЖХ-ФЛД для определения концентрации аспарагиновой кислоты; и ВЭЖХ-ФЛД анализ.

Фаза 1: Кислотный гидролиз

- Последовательно переливают следующие вещества в пробирку из затемненного стекла объемом 4 мл с завинчивающейся крышкой (4.2.):
- 0,2 мл раствора метабисульфита натрия 10 г/л (3.1.),
- 2 мл образца вина,
- 2 мл 6 M HCl (3.2.);
- нагревают до 108 °C (± 2 °C) на горячей плите в течение 72 часов;
- переливают в 10-мл колбу, добавляют 2,5 мл 5 M NaOH (3.3.) и доводят до метки сверхчистой водой.

Проверка процесса кислотного гидролиза подробно описана в пункте 6.

Фаза 2: Подготовка к ВЭЖХ-анализу

Метод предусматривает реакцию дериватизации аспарагиновой кислоты орто-фталальдегидом (OPA).
Чтобы подготовить образцы для анализа методом ВЭЖХ, выполняют следующие действия:

Калибровочные растворы и образцы вина перед гидролизом:
- 1 мл образца анализируемого раствора микрофильтруют (фильтр 0,2 мкм) в колбу вместимостью 20 мл,
- добавляют 0,2 мл внутреннего стандарта (3.5.1.),
- доводят до метки сверхчистой водой.

Пробы после гидролиза:
- 5 мл образца анализируемого раствора микрофильтруют (фильтр 0,2 мкм) в колбу вместимостью 20 мл,
- добавляют 0,2 мл внутреннего стандарта (3.5.1.),
- доводят до метки сверхчистой водой.

Этап 3: ВЭЖХ-анализ

Инструментальные параметры для анализа методом ВЭЖХ-ФЛД могут быть следующими:
Температура печи: 40 °C
Инжекция: 10 мкл
Длина волны FLD (λ): λex = 340 нм; λem = 450 нм.
Разделение проводится в градиентном режиме (см. элюенты в пункте 3.15.):

Время	**%B**	**%C**	**%D**	**Поток**
0.00	100.0	0.0	0.0	1.1
3.00	100.0	0.0	0.0	1.1
15.00	50.0	25.0	25.0	1.1
17.00	84.0	8.0	8.0	1.1
18.00	100.0	0.0	0.0	1.1
Время остановки: 21 минута + 2 минуты после остановки				

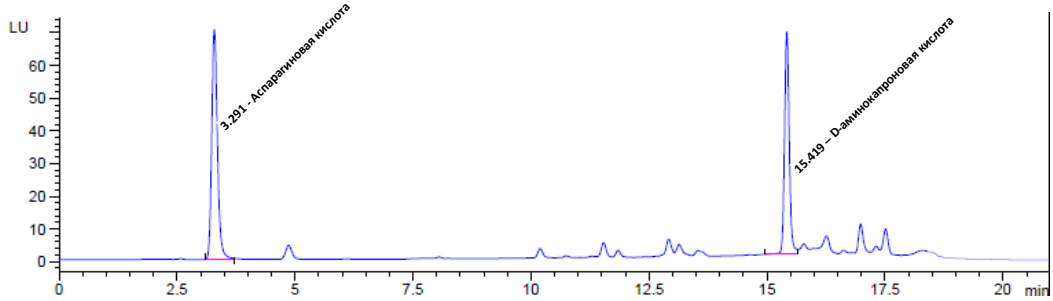
Ниже приведен пример режима автоматической дериватизации с автоматическим пробоотборником:

- Положение реагентов в автодозаторе:
  - позиция 1: метанол,
  - позиция 3: орто-фталальдегид OPA,
  - позиция 4: пустая пробирка,
  - позиция 11: сверхчистая вода.

- Фазы дериватизации:
  - берут 2,0 мкл из воздуха,
  - берут 20,0 мкл из пробирки 1,
  - переносят 20,0 мкл в пробирку 4,
  - отбирают 5,0 мкл из образца,
  - переносят 5,0 мкл в гнездо,
  - отбирают 0,0 мкл из пробирки 1 (для очистки внешней стороны иглы),
  - берут 5,0 мкл из пробирки 3,
  - переносят 5,0 мкл в гнездо,

- перемешивают 10,0 мкл в гнезде, 10 раз,
- выдерживают 0,5 мин,
- вводят.

Если полученные результаты превышают предел калибровочной кривой, образец разбавляют соответствующим образом и проводят повторный анализ.



Хроматограмма, полученная из красного вина

6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для каждой серии анализов контроль качества должен осуществляться путем анализа образца вина, к которому добавлено 100 мг/л аспарагиновой кислоты. Образец, подготовленный в соответствии с пунктом 5, анализируется в начале серии. Полученные результаты, выраженные в процентах выхода, заносятся в контрольную таблицу.

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА: ПАРАМЕТРЫ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ВАЛИДАЦИИ

- Линейность

Негидролизованные, недериватизированные калибровочные растворы известной концентрации используются для моделирования всего аналитического процесса.

Каждая последовательность, чтобы быть принятой, должна содержать калибровочные кривые с R2 > 0,990 (рис. 1).

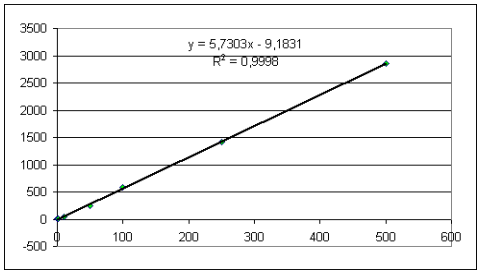


Рисунок 1

- Восстановление и матричный эффект

Водные растворы:

Скорость восстановления для процессов кислотного гидролиза и дериватизации проверяется путем сравнения исходных водных растворов аспарагиновой кислоты до и после гидролиза. Были приготовлены три раствора определенной концентрации (25, 100 и 200 мг/л); полученные данные приведены в следующей таблице:

	Тест 1	**Тест 2**	**Тест 3**
До гидролиза (мг/л)	25.4	109	213
После гидролиза (мг/л)	25.2	108	213
Коэффициент восстановления	**99.2**	**99.1**	**100**

Вино:

Применялся метод стандартных добавок к белому и красному вину (поэтапные добавки 50 мг/л и 200 мг/л полиаспартата калия для проверки матричных интерференций при определении полиаспартата калия (KPA). Для каждого уровня было проведено 5 тестов на повторяемость.

	Красное вино без добавок (мг/л)	**Красное вино +50 (мг/л)**	**Красное вино +200 (мг/л)**	**Белое вино без добавок (мг/л)**	**Белое вино +50 (мг/л)**	**Белое вино +200 (мг/л)**
Повторение (с R1-NH_2)	84.0	123.9	258.2	121.9	164.6	294.2
	85.4	127.3	259.4	123.2	163.3	291.5
	83.8	125.1	250.2	121.9	170.3	291.3

	87.7	124.4	253.5	119.5	161.9	284.8
	83.2	126.1	256.9	123.3	160.0	287.4
Среднее знач. (с R1-NH_2)	84.8	125.4	255.6	122.0	164.0	289.8
S_r (с R1-NH_2)	1.8	1.4	3.8	1.5	3.9	3.7
Среднее знач. (с добавлением KPA)	-	46.6	196.3	-	48.3	193.0
S_r(с добавлением KPA)	-	2.8	5.0	-	4.9	3.8
Крит. Horrat r	-	0.99	0.52	-	1.71	0.48
Теоретический KPA	-	50	200	-	50	200
Коэффициент восстановления KPA %	-	93	98	-	94	96

- S_r (в асп. кислоте): стандартное отклонение тестов на повторяемость, выраженное в аспарагиновой кислоте
- S_r (в KPA): стандартное отклонение тестов на повторяемость, выраженное в KPA
- Rec KPA %: восстановление в KPA

Восстановление должно быть в пределах 80-110%. Повторяемость соответствует критерию Horrat.

Пределы обнаружения и количественного определения:

Учитывая, что вино естественным образом содержит аспарагиновую кислоту, было принято решение определить LoD и LoQ на основе отношения сигнал/шум, определенного для образца вина.

РАСЧЕТ ПРЕДЕЛОВ ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕР N°3: ОТНОШЕНИЕ СИГНАЛ/ШУМ (S/N) ДЛЯ НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ		
C	24.74	Значение концентрации образца вина
S/N	122.5	Отношение сигнал/шум

LoD	**0.7**	Предел обнаружения
LoQ	**2.1**	Предел количественного определения (3 x LoD)

8. РАСЧЕТ И ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрация аспарагиновой кислоты в миллиграммах на литр (мг/л), присутствующая в образцах, рассчитывается с помощью процессора программы сбора.

Количество добавленного полиаспартата калия (KPA) определяется по разнице между образцом, подвергнутым гидролизу, и образцом, не подвергнутым гидролизу, без добавления добавок:

$$KPA(mg/L) = (AsparticAcid_{hydrolysed_wine} - AsparticAcid_{wine_w/o_addition}) \cdot f_{KPA}$$

где *fKPA* – коэффициент преобразования полиаспартата калия в аспарагиновую кислоту, рассчитанный из отношения молекулярной массы мономера полиаспартата калия к молекулярной массе аспарагиновой кислоты, в соответствии со следующим уравнением:

$$f_{KPA} = \frac{MM_{KPA_monomer}}{MM_{aspartic_acid}} = 1.15$$

Результаты выражены в мг/л с точностью до 1 значащей цифры.

9. БИБЛИОГРАФИЯ

- OIV-MA-AS1-10 (OENO 7/2000)

Метод OIV-MA-AS323-12 Тип метода: IV

Одновременный анализ железа, меди, калия, кальция и марганца в винах с использованием MP/AES (атомно-эмиссионная спектрометрия с индуцированной микроволнами плазмой)

(Резолюция OIV-OENO 637-2021)

1 Область применения

Данный метод IV типа, основанный на атомно-эмиссионной спектрометрии с азотной плазмой, позволяет одновременно определять в винах следующие элементы:

Медь 0,05-1 мг/л$^{-1}$

Железо 1-10 мг/л$^{-1}$

Калий 15-1200 мг/л$^{-1}$

Кальций 1-100 мг/л$^{-1}$

Марганец 0.25-4 мг/л$^{-1}$

При необходимости каждая лаборатория, использующая данный метод, обязана заново определить и, возможно, расширить область применения с помощью валидационного исследования.

2 Библиография

- ISO 78-2: Химия - Макеты стандартов.
- ISO 3696: Вода для аналитических лабораторий.
- Резолюция OIV OENO 418-2013.

3 Сущность метода

Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуцированной микроволнами плазмой (MP-AES) – это спектроскопический метод элементного анализа, работающий по принципу атомной эмиссии с оптическим детектированием.

Образец в жидком виде вводится в концентрический распылитель, где аэрозоль образца генерируется через двухпроходную циклоническую распылительную камеру, а затем вводится в центр плазмы с помощью плазменной горелки. Плазма генерируется с помощью волновода, который фокусирует и поддерживает микроволновую энергию вокруг факела. Таким образом, образец десольватируется, атомизируется и ионизируется, что приводит к возбуждению атомов и ионов, которые затем попадают в оптическую систему монохроматора.

CCD-детектор позволяет одновременно анализировать фон и сигнал для повышения точности анализа.

Этот прибор работает на азотной плазме, генерируемой из сжатого воздуха, что позволяет снизить эксплуатационные расходы по сравнению с другими методами спектроскопии для элементного анализа (ICP или AA).

4 Реактивы и растворы

Если не указано иное, следует использовать только реагенты признанного аналитического качества.

4.1 Сверхчистая, деминерализованная вода с удельным сопротивлением 18 МОм (ISO standard 3696)

4.2 Моно-или многоэлементный раствор(ы) (1000 или 10000 мг/л$^{-1}$) для анализируемых минеральных элементов (Ca, Cu, Fe, K и Mn) и для индия (In), используемого в качестве внутреннего контроля. По возможности используют сертифицированные растворы.

4.3 Внутренний контроль (в качестве примера): приготовленные моно- или многоэлементные синтетические растворы и контрольное вино, для которого конечные значения были получены в сертифицированных условиях (сертифицированное вино или вино, полученное в результате межлабораторного сравнения).

4.4 Азотная кислота в концентрации более 60% (об. /об.), для анализа следов (CAS No. 7697-37-2)

4.5 Этанол, чистота более 99% (об. /об.) (CAS No. 64-17-5)

4.6 Хлорид цезия, чистота более 99% (об. /об.) (CAS No. 7647-17-8)

5 Приборы и оборудование

5.1 Атомно-эмиссионный спектрометр, соединенный с азотной микроволновой плазмой (MP- AES)

Примечание: MP-AES может быть оснащен петлей для переноса образца для увеличения срока службы расходных материалов (распылителя и плазменной горелки). Эта система осуществляет промывку азотной кислотой каналов ввода пробы в распылительную камеру. Это снижает как количество образца, вводимого в распылитель, так и уровень износа оборудования.

5.2 Многоканальные микропипетки, подходящие для забора переменных объемов

5.3 Мерные колбы класса A

6 Подготовка образцов

6.1 Пример подготовки диапазона калибровки

Количественное определение осуществляется путем внешней калибровки с использованием калибровочных растворов, что позволяет построить 5-точечные калибровочные кривые.

Объем калибровочных растворов регулируют до 12% об. /об. этанола и 0,2% об. /об. азотной кислоты. Пример диапазона калибровки:

мг/л-1	**S0**	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**
Cu	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1
Fe	0	1	2.5	5	7.5	10
K	0	400	600	800	1000	1200
Ca	0	10	25	50	75	100
Mn	0	0.5	1	2	3	4

6.2 Прямое разбавление образцов

Калибровочный диапазон, а также анализируемые образцы разбавляются до коэффициента разбавления 1:2 с помощью простого Y-образного устройства, расположенного на выходе перистальтического насоса. Образец (канал 1) разбавляется с помощью раствора азотной кислоты с содержанием 0,2% индия (600 мг·л$^{-1}$) и хлорида цезия (0,3 г·л$^{-1}$) (канал 2). Индий используется для контроля стабильности во всей аналитической последовательности, поэтому его интенсивность измеряется для всех анализируемых растворов.

Такое разбавление позволяет ограничить влияние насыщения, в частности, на калий. Азотная кислота производит незначительный эффект минерализации, который, хотя и частично, способствует проникновению органических соединений в плазму.

Меры предосторожности - При работе с кислотами операторы должны защищать руки и глаза. Работа с кислотами должна проводиться под колпаком с вытяжкой.

7 Порядок работы

Для достижения характеристик, описанных в пункте 8, используются следующие параметры:

7.1 Инструментальные параметры

Приведенное ниже описание относится к прибору MP-AES и содержит примеры аналитических условий. При необходимости лаборатория может вносить изменения.

Инструментальный параметр	**Характеристики**
Распылитель	OneNeb инертный концентрического типа
Распылительная камера	Двухпроходная циклонного типа
Трубка для образца	Черно-черная (средняя скорость потока 0,25 мл/мин)
Трубка для разбавителя (HNO_3 в концентрации 0,2%)	Черно-черная (средняя скорость потока 0,25 мл/мин)
Выходная трубка	Сине-голубой (средняя скорость потока 1
Продолжительность отбора проб	20
Продолжительность стабилизации	15
Продолжительность промывки	15
Скорость насоса	15 об/мин
Количество реплик	3
Клапан AVS4	**Характеристики**
Скорость насоса	10 об/мин
Время отбора проб	20 с (скорость: высокая)
Время коммутации	18 с
Время промывки	15 с (скорость: высокая)
Продолжительность стабилизации	20
Количество реплик	3

7.2 Получение результатов

	Медь	**Кальций**	**Железо**	**Калий**	**Марганец**	**Индий**
Продолжительность считывания	3 секунды					
Положение визуализации	0	10	0	20	0	0
Скорость потока распыления	0.5 мл/ мин	0.95 мл/мин	0.55 мл/ мин	0.9 мл/ мин	0.65 мл/ мин	0.75 мл/ мин
Скорость введения воздуха	Средняя					Высокая
Коррекция фона	Автоматическая					
Настройка калибровки	Рациональная					/
Длина волны анализа	327.395	445.478 нм	371.993 нм	404.414 нм	403.076 нм	325.600 нм

8 Выражение результатов

Результаты выражаются в мг/л$^{-1}$ анализируемого элемента, а количество десятичных знаков зависит от производительности метода для данного элемента. Поэтому медь и марганец выражаются с точностью до 2 десятичных знаков, железо – с точностью до 1 десятичного знака, а калий и кальций – с точностью до единицы измерения в соответствии с погрешностями измерений и пределами количественного определения метода.

9 Приложение: Пример внутренней валидации

Оценка эффективности и валидация были проведены в соответствии с практическим руководством по валидации, контролю качества и оценке обычного энологического метода анализа (Резолюция OIV-OENO 418-2013).

9.1 Получение данных

Всего было использовано 7 стандартных материалов (УРМ, легированные образцы и/или синтетические растворы), распределенных по диапазону, охватывающему область применения методов с точки зрения концентрации. Эти материалы были проанализированы в n = 5 сериях в условиях воспроизводимости и в пределах времени стабильности материала для рассматриваемого параметра. Для каждого материала и каждой серии было проведено p = 2 повторений. В отсутствие RM, могут быть использованы синтетические растворы, состоящие из 12% этанола и 0,2% азотной кислоты.

9.2 Точность результатов

Медь 327,395 нм (мг/л$^{-1}$)

Точность	**Материал 1** (розовое вино)	**Материал 2** (красное вино)	**Материал 3** (розовое вино)	**Материал 4** (красное вино)	**Материал 5** (игристое белое	**Материал 6** (белое вино)
искомое значение	0.05	0.15	0.25	0.5	0.75	1.0
Sr	0.0008	0	0.0032	0.0095	0.01	0.05
r	0.002	0	0.00885	0.02656	0.029	0.137
s_I	0.0015	0.00548	0.01500	0.01500	0.025	0.051
%CV	6.27	7.11	12.88	6.01	6.66	9.96

Где Sr – стандартное отклонение повторяемости, r – повторяемость, S_I – стандартное отклонение промежуточной точности и % CV – коэффициент вариации более широкой точности.

Железо 371.993 нм (мг/л$^{-1}$)

Точность	**Материал 1** (синтетический раствор)	**Материал 2** (красное вино)	**Материал 3** (игристое белое вино)	**Материал 4** (розовое вино)	**Материал 5** (красное вино)	**Материал 6** (красное вино)	**Материал 7** (белое вино)
искомое значение	1	1.5	2	2.3	5	7.5	10
Sr	0.078	0	0.045	0.032	0.109	0.145	0.212
r	0.217	0	0.125	0.088	0.307	0.406	0.255
s_I	0.106	0.055	0.088	0.122	0.294	0.280	0.415
%CV	24.11	6.68	8.63	10.51	11.56	7.19	8.06

Калий 404.414 нм (мг/л $^{-1}$)

Точность	**Материал 1** (синтетический раствор)	**Материал 2** (розовое вино)	**Материал 3** (игристое белое вино)	**Материал 4** (белое вино)	**Материал 5** (красное вино)	**Материал 6** (синтетический раствор)	**Материал 7** (красное вино)
искомое значение	15	**363**	404.5	675	800	1000	1253
Sr	0.4	**5.0**	2.8	6.0	4.0	5.6	10.8
r	1.2	**14.0**	7.9	16.8	11.2	15.7	13.0
s_I	1.0	**16.0**	19.3	33.5	22.7	41.6	37.1
%CV (k=2)	13.94	**8.54**	8.79	9.08	5.34	7.87	5.45

Кальций 445.478 нм (мг/л $^{-1}$)

Точность	**Материал 1** (синтетический раствор)	**Материал 2** (синтетический раствор)	**Материал 3** (белое вино)	**Материал 4** (игристое белое вино)	**Материал 5** (красное вино)	**Материал 6** (белое вино)	**Материал 7** (розовое вино)

искомое значение	0.5	1	6.8	27.5	54	68	100
Sr	0.08	0.03	0.07	0.32	0.83	0.41	0.86
r	0.23	0.09	0.20	0.90	2.33	1.16	0.15
s_I	0.14	0.089	0.15	1.49	2.00	2.06	3.28
%CV (k=2)	68.59	15.33	4.81	10.59	6.67	6.01	6.64

Марганец 403.076 нм (мг/л $^{-1}$)

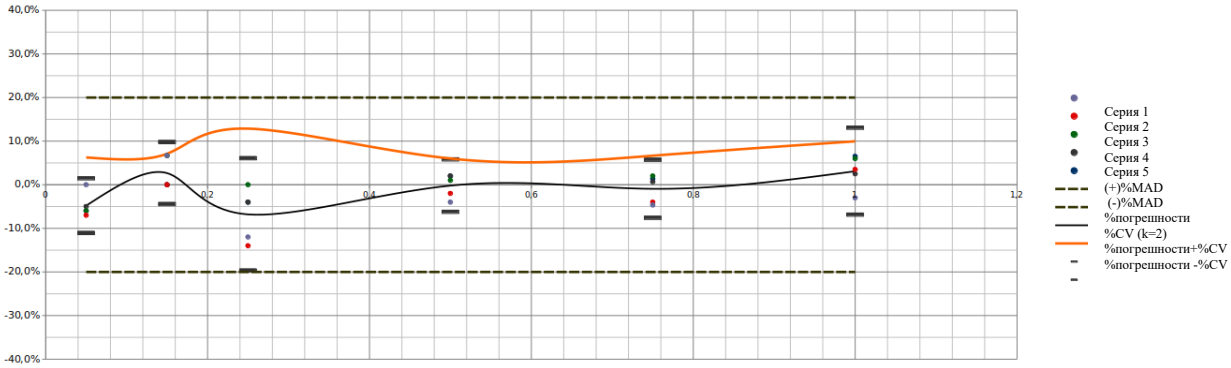
Точность	**Материал 1** (синтетический раствор)	**Материал 2** (красное вино)	**Материал 3** (розовое вино)	**Материал 4** (красное вино)	**Материал 5** (игристое белое вино)	**Материал 6** (розовое вино)	**Материал 7** (белое вино)
Контрольное	0.25	0.54	0.67	1.34	2	3	4
Sr	0.019	0.008	0.006	0.012	0.015	0.016	0.020
r	0.054	0.023	0.018	0.034	0.042	0.045	0.017
s_I	0.023	0.011	0.021	0.028	0.051	0.092	0.153
%CV	17.46	3.69	5.63	3.67	4.78	5.68	7.22

9.3 Истинность метода

Профили точности устанавливаются графически.

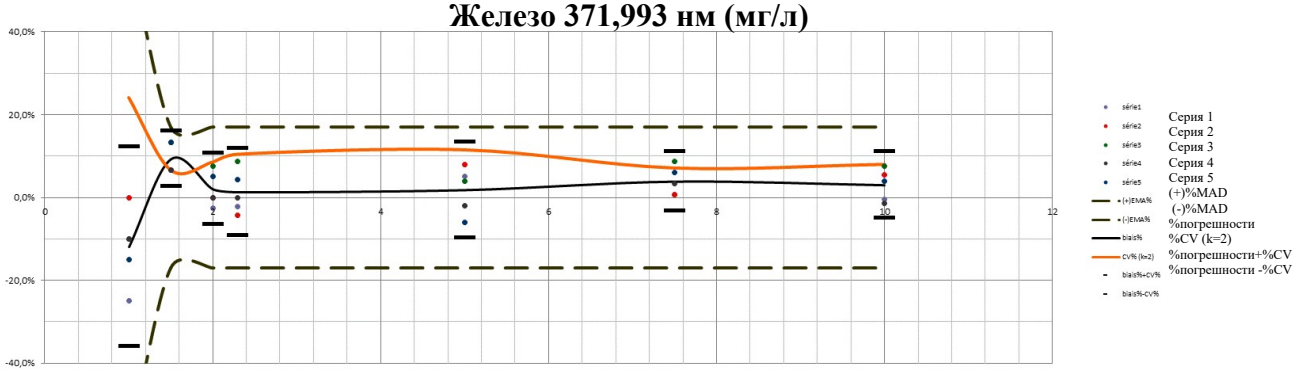
СБОРНИК МЕЖДУНАРОДНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА - MOBB
Одновременный анализ железа, меди, калия, кальция и марганца в винах с использованием MP/AES (атомно-эмиссионная спектрометрия с индуцированной микроволнами плазмой)

Профиль точности
Медь 327,395 нм (мг/л)

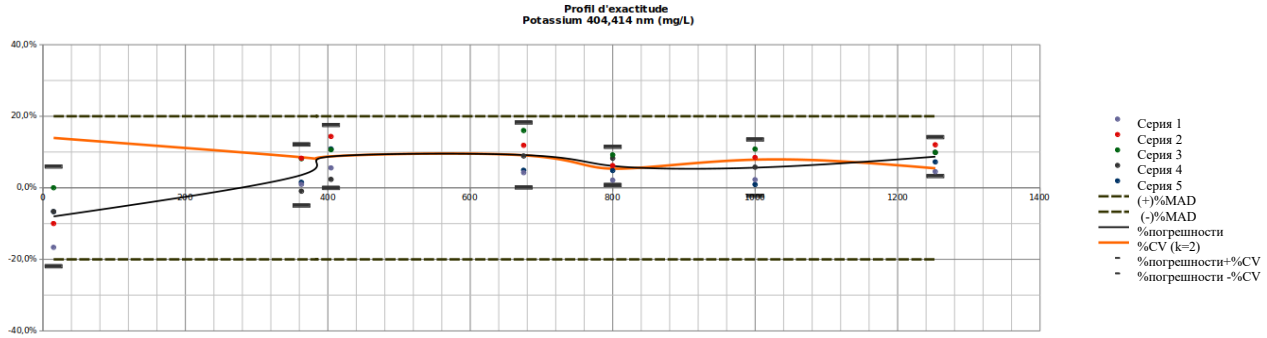


Profil d'exactitude
Fer 371,993 nm (mg/L)

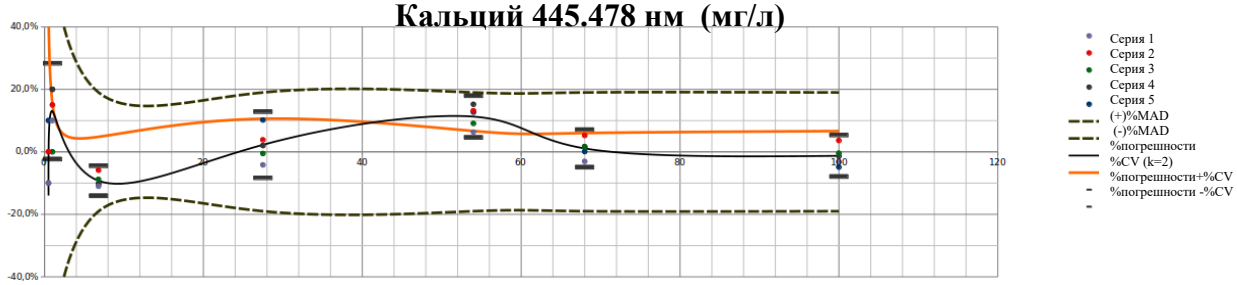
Профиль точности
Железо 371,993 нм (мг/л)



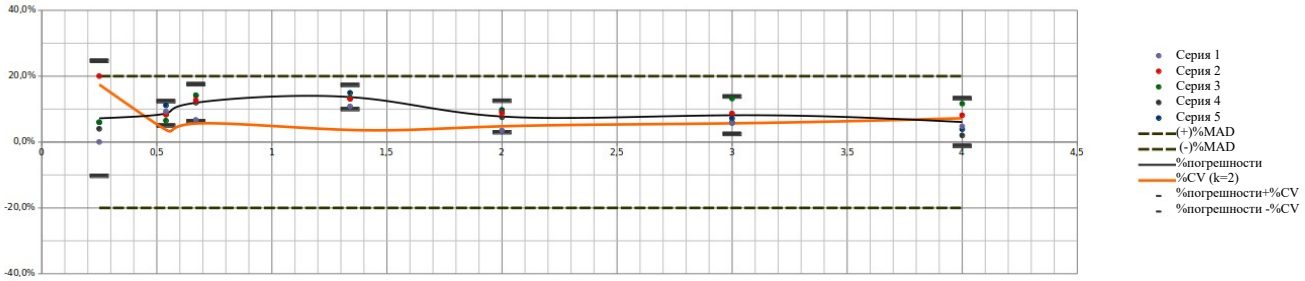
Профиль точности
Калий 404.414 нм (мг/л)



Профиль точности
Кальций 445.478 нм (мг/л)



Профиль точности
Марганец 403.076 нм (мг/л)



Проверка достоверности осуществляется для каждого уровня концентрации путем сравнения интервала, создаваемого промежуточной точностью вокруг измеренного значения ($CV_{точности}$), с интервалом MAD (максимально допустимое отклонение) вокруг эталонного значения материала. Истинность принимается, если $CV_{точности}$ находится в пределах MAD. Что касается MAD, тесты на истинность подтверждены для всех исследуемых элементов.

9.4 Пределы количественной оценки

Пределы количественного определения (LOQ) устанавливаются путем изучения диапазона, близкого к нижним предельным значениям. Значение, проверенное на LOQ, подтверждается, если его % CV (k=2) <60% (Резолюция OIV-OENO 418-2013).

Были подтверждены следующие LOQ:

мг/л-1	**Метод LOQ**
Медь	0.05
Железо	1
Калий	15
Кальций	1
Марганец	0.25

Метод OIV-MA-AS4-01 Тип метода: IV

Микробиологический анализ вин и сусла
Обнаружение, дифференциация и подсчет микроорганизмов

(Резолюция OIV-Oeno 206/2010)

Цель:

Микробиологический анализ направлен на отслеживание спиртового брожения и/или малолактического брожения и выявление микробиологических инфекций, а также позволяет обнаружить любые аномалии не только в готовом продукте, но и на различных этапах производства.

Комментарий:

Все эксперименты должны проводиться в нормальных микробиологических асептических условиях, с использованием стерилизованного материала, вблизи пламени бунзеновской горелки или в помещении с ламинарным потоком и обжиганием отверстий пипеток, пробирок, колб и т.д. Перед проведением микробиологического анализа необходимо убедиться, что анализируемые образцы взяты правильно.

Область применения:

Микробиологический анализ может применяться к винам, суслам, мистелям и всем подобным продуктам, даже если они были изменены бактериальной активностью. Эти методы также могут быть использованы при анализе промышленных препаратов отдельных микроорганизмов, таких как сухие активные дрожжи и молочные бактерии.

Методы микробиологического анализа:

1. Реагенты и материалы
2. Установки и оборудование
3. Отбор проб
4. Проверка качества
4.1 цель
4.2 принцип
4.3 методика
4.3.1 проверка качества воздуха
4.3.2 испытания качества инкубатора

5. Микроскопические методы для обнаружения, дифференциации микроорганизмов и прямого подсчета дрожжей

5.1. *Микроскопическое исследование жидкостей или отложений*

5.2. Окрашивание по Граму для дифференциации бактерий, выделенных из колоний (см. параграф 6)

5.3. Тест на каталазу для дифференциации бактерий, выделенных из колоний (см. параграф 6)

5.4. Подсчет дрожжевых клеток - гемоцитометрия

5.5. Подсчет дрожжевых клеток - окрашивание дрожжевых клеток метиленовым синим

6. Подсчет микроорганизмов с помощью культуры

6.1 Обнаружение, дифференциация и подсчет количества микроорганизмов (определение количества бактерий посевом)

6.2 Культура в жидкой среде – «Наиболее вероятное число» (НВЧ)

1. РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Действующие лабораторное оборудование и аппаратура, указанные в ISO 7218:2007 – Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных – Общие правила проведения микробиологических исследований.

Рекомендуются следующие из них:

- Общие лабораторные материалы и стеклянная посуда, стерильные (стерилизованные или готовые стерильные).
- Пробирки (16x160 мм или аналогичные), содержащие 9 мл стерильной пептонной воды (Триптон: 1 г/л) или другие разбавители, которые будут использоваться для серийного разведения образцов.
- Этанол для горелок и пинцетов.
- Перекись водорода 3% раствор.
- Микропипетка со стерильными наконечниками: 1 мл и 0,2 мл.
- L-образные или треугольные изогнутые стеклянные шпатели в форме хоккейной клюшки или пластиковые шпатели.
- Пинцет из нержавеющей стали с плоскими краями.
- Стерильные мембраны из смешанного эфира целлюлозы (или эквивалентные) пористостью 0,2 и 0,45 мкм, диаметром 47 мм или 50 мм, возможно с нанесенной на поверхность сеткой, упакованные поштучно.
- Стерильные пробирки.
- Стерильные пипетки на 10 мл.

2. УСТАНОВКИ И ОБОРУДОВАНИЕ

Современное лабораторное оборудование и аппаратура, перечисленные в стандарте ISO 7218:2007 - Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных - Общие правила проведения микробиологических исследований.

Рекомендуются следующие из них:

-Микробиологический шкаф или шкаф ламинарного потока. При отсутствии необходимо работать в пределах 50 см от газовой горелки.

- Весы, с точностью ± 0,01 г.
- Автоклав.
- Инкубатор с настройками от 25°C до 37°C.
- pH-метр, с точностью ± 0,1 единиц pH и минимальным порогом измерения ± 0,01 единиц pH.
- Холодильники, установленные на температуру 5 ± 3°C, и морозильники, температура которых должна быть ниже -18°C, предпочтительно -24 ± 2°C.
- Термостатическая ванна, установленная на 45 ± 1°C
- СВЧ-печь.
- Оптический микроскоп.
- Газовая горелка.
- Устройство для подсчета колоний.
- Оборудование для культуры в модифицированной атмосфере (герметичная банка, в которой может быть создан анаэробиоз).
- Фильтрующий аппарат с фильтрами диаметром 47 мм или 50 мм.
- Вихревой смеситель «Vortex» или аналог.
- Инкубатор для стерилизации сухим горячим воздухом
- Центрифуга
- Насос

3. ПОДГОТОВКА ПРОБ

Образец должен воспроизводить микробиологию всей массы сусла или вина, подлежащего анализу. По возможности, перед отбором проб масса должна быть гомогенизирована, чтобы ресуспендировать микроорганизмы, которые могут оседать на дно контейнера. Если гомогенизация нежелательна, пробы следует брать из мест, где могут присутствовать микроорганизмы (например, на дне резервуаров или бочек при обнаружении дрожжей), но в этом случае результаты не будут количественными. Перед тем как взять пробу из крана, последний необходимо обжечь пламенем и промыть 2-3 литрами жидкости. Проба должна быть помещена в стерильное пространство. Образец должен храниться в холодильнике и анализироваться как можно быстрее. Для микробиологического исследования требуется следующее количество образцов:

Сусло, или перебродившее сусло, или вино из хранилища: не менее 250 мл;
Бутилированное или упакованное вино: не менее одной единицы, независимо от емкости;

4. Контроль качества

4.1 Цель

Эти тесты направлены на заблаговременное выявление риска микробной инфекции.

4.2 Сущность метода

Эта методика основана на органолептических и внешних изменениях (помутнения, пленки, осадки, необычные цвета), проявляющихся в вине при определенных условиях аэрации и температуры, которые могут привести к микробиологической активности. Характер изменений должен быть подтвержден микроскопическим исследованием.

4.3 Проведение исследования

4.3.1 Контроль качества воздуха

Образец вина объемом 50 мл после фильтрации на грубой стерильной фильтровальной бумаге помещают в 150 мл стерильную коническую колбу, закупоренную ватой, и оставляют при комнатной температуре не менее чем на 3 дня. В течение этого времени исследуется прозрачность, цвет и возможное наличие помутнений, осадка и пленок. Микроскопическое исследование проводится в случае обнаружения помутнения, осадка или пленки или изменения цвета.

4.3.2 Инкубаторный контроль качества

Образец вина объемом 100 мл после фильтрации на грубой стерилизованной фильтровальной бумаге помещают в стерильную коническую колбу объемом 300 мл, закрытую ватой, ставят в инкубатор при 30°C и исследуют не менее чем через 72 часа. Органолептические или видимые изменения могут свидетельствовать о развитии микроорганизмов. Поэтому необходимо провести микроскопическое исследование.

5. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, А ТАКЖЕ ДЛЯ ПРЯМОГО ПОДСЧЕТА ДРОЖЖЕЙ

5.1 Микроскопическое исследование жидкостей или осадков

Цель:

Микроскопическое исследование при понижении температуры направлено на обнаружение и дифференциацию дрожжей от присутствующих бактерий

по их размеру и форме. Микроскопическое наблюдение дает возможность отличить жизнеспособные и нежизнеспособные микроорганизмы.

Комментарии:

При соответствующем окрашивании (см. ниже) можно определить количество жизнеспособных дрожжей.

Сущность метода:

Этот метод основан на увеличении, производимом микроскопом, что позволяет наблюдать микроорганизмы, размер которых составляет порядка микрона.

Проведение исследования:

Микроскопическое исследование может проводиться непосредственно на жидкости или на осадке.

Прямое наблюдение за жидкостью будет эффективно только при достаточно высокой численности микроорганизмов (более 5 x 10^5 клеток/мл).

Если в вине обнаружена низкая популяция микроорганизмов, необходимо сконцентрировать образец. Для этого около 10 мл гомогенизированного вина центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 5-15 минут. После декантации надосадочной жидкости осадок повторно суспендирует в жидкость, оставшуюся на дне пробирки для центрифуги.

Для проведения микроскопического наблюдения капля жидкого образца или гомогенизированного осадка помещается на чистое предметное стекло с помощью пипетки Пастера или стерилизованной проволочной вставки. Каплю помещают на предметное стекло на столике микроскопа и накрывают покровным стеклом. Наблюдение проводится в чистой области или, предпочтительно, в фазовом контрасте, что позволяет лучше рассмотреть детали. Обычно используется увеличение от 400 до 1000 крат.

5.2. Окрашивание по Граму для дифференциации бактерий, выделенных из колоний (см. параграф 6)

Цель: Окрашивание по Граму используется для дифференциации молочных бактерий (грамположительных) и уксуснокислых бактерий (грамотрицательных), а также для наблюдения за их морфологией.
Комментарий: следует помнить, что окрашивание по Граму не является достаточным для заключения, поскольку помимо молочнокислых и уксуснокислых бактерий могут присутствовать и другие бактерии.
Проведение исследования:
Цвет окрашивания зависит от различий в структуре и химическом составе клеточных стенок между грамположительными и грамотрицательными бактериями. У грамотрицательных бактерий клеточные стенки, богатые липидами, имеют гораздо меньшее количество пептидогликана. Это позволяет проникать спирту и выводить генцианвиолет, образуя при этом бесцветную клетку, которая затем будет вновь окрашена в красный цвет сафранином. Напротив, клеточные стенки грамположительных бактерий содержат большое количество пептидогликана и низкую концентрацию липидов. Таким образом, толстая пептидогликановая стенка и дегидратация, вызванная спиртом, не позволяют спирту устранить окраску комплекса генцианфиолет-йод.
Окрашивание по Граму теряет свою эффективность, если оно проводится на слишком старой культуре. Таким образом, бактерии должны находиться в фазе экспоненциального роста в течение 24-48 часов. Окрашивание по Граму проводится после выделения колоний и культивирования в жидкости.
Растворы:
Используемая вода должна быть дистиллированной.
1. Раствор генцианвиолета
Приготовление: взвешивают 2 г генцианвиолета фиолетового, помещают в коническую колбу емкостью 100 мл и растворяют в 20 мл 95% об. спирта. Растворяют 0,8 г оксалата аммония в 80 мл дистиллированной воды. Смешивают оба раствора вместе и используют только через 24 часа. Фильтруют через бумагу во время использования. Хранят в темной колбе вдали от источника света.
2. раствор Люголя
Приготовление: растворяют 2 г йодистого калия в минимальном количестве воды (от 4 до 5 мл).1 г йода растворяют в полученном растворе. Доводят объем до 300 мл дистиллированной водой. Хранят в темной колбе вдали от источника света.
3. Раствор сафранина:

Приготовление: взвешивают 0,5 г сафранина в конической колбе емкостью 100 мл, растворяют в 10 мл 95% об. спирта и добавляют 90 мл воды. Перемешивают. Хранят в темной колбе вдали от света.

Проведение исследования:

Подготовка мазка

Делают высев из субкультуры бактерий в жидкой или твердой среде. Собирают молодые бактерии из осадка (после центрифугирования жидкой культуры) или непосредственно из твердой среды с помощью петли или проволочной вставкой и смешивают в капле стерилизованной воды. Делают мазок на предметном стекле, нанеся на него каплю микробной суспензии. Дают мазку высохнуть, а затем проводят фиксацию, быстро пропуская предметное стекло 3 раза через пламя бунзеновской горелки или эквивалент. После охлаждения проводят окрашивание.

Окрашивание

Наносят несколько капель раствора генцианвиолета на фиксированный мазок. Оставляют на 2 минуты для реакции и смывают водой.

Наливают 1-2 капли раствора люголя. Оставляют для реакции на 30 секунд. Промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

Наливают 95% об. спирта, оставляют на 15 секунд. Промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

Наливают несколько капель раствора сафранина, оставляют для реакции на 10 секунд. Промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

Наносят на мазок каплю иммерсионного масла.

С помощью иммерсионного объектива наблюдают в микроскоп в светлом поле.

Итоги: Молочные бактерии имеют фиолетовую или темно-синюю окраску (грамположительные). Уксуснокислые бактерии окрашены в красный цвет (грамотрицательные).

5.3 Каталазный тест для дифференциации бактерий, выделенных из колоний (см. параграф 6)

Цель: Этот тест направлен на проведение различия между уксуснокислыми и молочнокислыми бактериями. Дрожжи и уксуснокислые бактерии дают положительную реакцию. Молочные бактерии дают отрицательную реакцию.

Примечание: следует учитывать, что теста на каталазу недостаточно, так как помимо молочнокислых и уксуснокислых бактерий могут присутствовать и другие бактерии.

Сущность метода:

Тест каталазу основан на свойстве аэробных микроорганизмов разлагать перекись водорода с выделением кислорода.:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

Реагент:

12 Объем раствора перекиси водорода (3%)

Приготовление: наливают 10 мл 30% по объему перекись водорода в мерную колбу емкостью 100 мл и добавляют свежепрокипяченую дистиллированную воду. Перемешивают и хранят в холодильнике в темной колбе. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Проведение исследования:

Помещают каплю 3% об. перекиси водорода на предметное стекло и добавляют небольшой образец молодой колонии. Если выделяется газ, можно сделать вывод, что в культуре происходит каталазная активность. Иногда трудно сразу заметить выделение газа, особенно оно происходит в случае присутствия бактериальных колоний. Поэтому рекомендуется исследовать культуру под микроскопом (объектив 10крат. увел.).

5.4. Подсчет дрожжевых клеток – Гемоцитометрия

5.4.1 Область применения

Определение концентрации дрожжевых клеток в бродильных суслах или винах, а также АСД (активные сухие дрожжи). Требуется высокая концентрация клеток: не менее 5×10^6 клеток/мл. Ферментирующие сусла и вина могут быть подсчитаны напрямую, ADY необходимо разбавить в 1000 или 10 000 раз. Сусло или вино, содержащие меньшее количество клеток, должны быть центрифугированы (3000 г, 5 минут) и осадок ресуспендирован в известном объеме.

5.4.2 Сущность метода

Капля суспензии дрожжевых клеток помещается на поверхность стекла со счетной камерой. Счетная камера имеет определенный объем и разделена на квадраты на поверхности стекла. Подсчет производится под микроскопом в светлом поле. Фазовый контраст не показан, если клетки окрашены.

5.4.3 Реагенты и материалы

- Гемоцитометр, двухкамерный, предпочтительно с зажимами: Bürker, Thoma, Malassez, Neubauer.
- Покровное стекло для гемоцитометра: обычные покровные стекла (шириной 0,17 мм) не подходят для этого использования, поскольку они гибкие и не гарантируют постоянство ширины камеры.
- Пипетки с тонкими наконечники, объем 1 и 10 мл.
- Объемная колба, 100 мл.
- Мензурка, 250 мл.

5.4.4 Установки и оборудование

- Микроскоп с ярким полевым освещением: увеличение 250-500 крат.

Фазовый контраст противопоказан.

- Магнитная пластина и перемешивающий стержень.

Гемоцитометры выпускаются с различными счетными камерами: Bürker, Thoma, Malassez, Neubauer. Необходимо убедиться в идентичности и объеме используемой счетной камеры. Камеры Bürker, Thoma, Neubauer имеют глубину 0,1 мм, камера Malassez, - 0,2 мм.

Камера Thoma имеет один центральный большой квадрат (1 $мм^2$), поэтому ее объем составляет 0,1 $мм^3$ (10^{-4} мл). Этот большой квадрат подразделяется на 16 квадратов, которые в свою очередь делятся на 16 меньших по размеру квадратов. Каждый из меньших квадратов имеет длину сторон 0,05 x 0,05 мм и глубину 0,1 мм, так что объем каждого меньшего квадрата составляет 0,00025 $мм^3$ (25 x 10^{-8} мл). Также возможен счет в средних по размеру квадратах. Каждый средний квадрат имеет 16 меньших по размеру квадратов 0,2 x 0,2 мм и площадь 0,004 $мм^3$, или 4 x 10^{-6} мл объема.

Камера Bürker содержит 9 больших квадратов площадью 1 $мм^2$, которые разделены на 16 средних квадратов со сторонами по 0,2 мм, разделенными двойными линиями с отступом в 0,05 мм. Площадь средних квадратов составляет 0,04 $мм^2$, а объем 0,004 $мм^3$. Площадь маленьких квадратов, образованных двойными линиями, составляет 0,025 $мм^2$

Большие, средние и малые квадраты камер Bürker, Thoma, Neubauer имеют одинаковый размер. Средние квадраты камеры Bürker не содержат внутри себя другие линии, поэтому их, вероятно, легче всего сосчитать.

5.4.5 Проведение исследования

Счетная камера и покровный лист должны быть чистыми и сухими перед использованием. Может потребоваться очистка контролируемой области, так как грязные камеры влияют на объем образца. Их необходимо очистить деминерализованной водой или этанолом и высушить мягкой бумагой.

Если необходимо подсчитать флоккулирующие дрожжи. Среда для суспензии должна содержать 0,5% серной кислоты, чтобы избежать флоккуляции, однако это уменьшает возможность окрашивания метиленовым синим раствором и усложняет подсчет жизнеспособных и мертвых клеток. Ресуспензию можно проводить с помощью сонификации.

Образец помещают на предметное стекло с помощью пипетки с тонким наконечником и следуют одной из следующих процедур.

Процедура 1

Хорошо перемешивают суспензию дрожжей. Если требуется, делают десятикратные разбавления. Если проводится окрашивание метиленовым синим раствором, делают его на наиболее разбавленном образце и смешивают 1 мл образца с 1 мл метиленового синего раствора. Постоянно встряхивают дрожжевую суспензию. Берут пробу пипеткой с тонким наконечником (4-5 капель суспензии) и помещают небольшую каплю дрожжевой суспензии (при необходимости разбавленной) на каждую из двух линеек предметного стекла. Накрывают его покровным стеклом в течение 20 секунд и плотно прижимают зажимами. Счетная область должна быть полностью заполнена, но жидкость не должна выходить за пределы.

Процедура 2

Помещают жесткий покровный лист так, чтобы обе счетные камеры были одинаково покрыты. С помощью зажимов прижимают покровный лист к опорным участкам до появления радужных линий (кольца Ньютона). Если зажимов нет, при заполнении камеры покровное стекло не перемещают.

Постоянно встряхивают дрожжевую суспензию. Берут пробу пипеткой с тонким наконечником (4-5 капель суспензии) и дают небольшой капле пробы стечь между гемоцитометром и покровным стеклом. Ту же процедуру проводят в другой части покровного листа. Область подсчета

должна быть полностью заполнена, но жидкость не должна выходить за пределы.

Дают подготовленному предметному стеклу постоять три минуты, чтобы дрожжевые клетки осели, и помещают его под микроскоп.

Отсчитывают 10 средних квадратов в каждой выделенной области. Необходимо провести стандартные процедуры, чтобы избежать подсчета дважды одного и того же квадрата. Клетки, касающиеся или находящиеся на верхней или правой пограничных линиях, не учитываются, учитываются те, которые лежат на нижней или левой пограничных линиях. Клетки почкующихся дрожжей считаются как одна клетка, если размер почки меньше половины размера материнской клетки, в противном случае считаются обе клетки.

Для получения точных результатов подсчета клеток рекомендуется подсчитать в среднем 200-500 общих дрожжевых клеток. Подсчеты с обеих сторон предметного стекла должны совпадать в пределах 10%. Если используется разведение, то при подсчете необходимо использовать коэффициент разведения.

5.4.6 Выражение результатов.

Если C – среднее число клеток, подсчитанных в одном квадрате среды со стороной 0,2 мм, то общая популяция T в образце составляет:

Выражается в клетках/мл $T = C \times 0{,}25 \times 10^6$ x коэффициент разведения

Если C – среднее число клеток, подсчитанных в одном маленьком квадрате со стороной 0,05 мм, то общая популяция T в образце составляет:

Выражено в клетках/мл $T = C \times 4 \times 10^6$ x фактор разбавления

5.4.7 Библиография

European Brewery Convention. Analytica Microbiologica – EBC. Fachverlag Hans Carl, 2001

5.5 Подсчет дрожжевых клеток - Окрашивание дрожжевых клеток метиленовым синим

5.5.1 Область применения

Этот метод позволяет быстро оценить процент жизнеспособных дрожжевых клеток, которые не окрашиваются (мертвые клетки окрашиваются в синий цвет). Метод применим ко всем образцам, содержащим дрожжи, за исключением сусла, содержащего сахар, более 100 г/л. Бактерии слишком малы, и их окрашивание не заметно при использовании этого метода.

Примечание: необходимо добиться хорошей фокусировки на разной глубине, чтобы корректно увидеть их окрашивание метиленовым синим раствором.

5.5.2 Сущность метода

Метиленовый синий раствор превращается в бесцветное производное под действием восстановительной активности жизнеспособных дрожжевых клеток. Мертвые дрожжевые клетки окрашиваются в синий цвет.

Жизнеспособность рассчитывается по соотношению между количеством жизнеспособных клеток и общим количеством клеток. Метод переоценивает «реальную» жизнеспособность, когда жизнеспособных клеток менее 80%, поскольку он не различает «живые» клетки и их способность к размножению (Жизнеспособные, но не культивируемые клетки).

Если концентрация сахара выше 100 г/л, большинство клеток светло-голубого цвета, поэтому данный метод не рекомендуется.

Если вино имеет низкий pH и сильно забуференное, краситель не может работать должным образом. В этом случае подсчет должен проводиться как минимум до первого десятикратного разведения.

5.5.3 Реагенты и материалы

Раствор A: Метиленовый синий, дистиллированный водный раствор, 0,5 г/500 мл.

Раствор B: KH_2PO_4, дистиллированная вода, 13,6 г/500 мл.

Раствор C: Na_2HPO_4 x 12 H_2O, дистиллированная вода, 2,4 г/100 мл.

Раствор D: 498,75 мл раствора B + 1,25 мл раствора C.

Раствор E: Смешивают 500 мл раствора D с 500 мл раствора A, чтобы получить конечный метиленовый синий забуференный раствор с pH приблизительно 4,6.

5.5.4 Установки и оборудование

Микроскоп, увеличение 250-500 крат. Фазовый контраст противопоказан. Предметные стекла микроскопа и покровные листы или гемоцитометр (камера Тома, Бюркера или Нойбауэра).

Пробирка и палочка для перемешивания. Пипетки с тонкими наконечниками.

5.5.5 Проведение исследования

Определение жизнестойкости

Суспензию дрожжей разбавляют метиленовом синим раствором в пробирке до тех пор, пока в суспензии не будет примерно 100

дрожжевых клеток в поле зрения микроскопа. Помещают небольшую каплю хорошо перемешанной суспензии на предметное стекло микроскопа и накрывают покровным стеклом. Исследуют микроскопически при увеличении 400 крат в течение 10 минут контакта с пятном.

Подсчитывают в общей сложности 400 клеток (Т), отмечая количество окрашенных в синий цвет (С) мертвых, разрушенных, сморщенных и плазмолизированных клеток. Дрожжевые клетки с почками считаются за одну клетку, если почка меньше половины размера материнской клетки. Если размер почки равен или больше половины размера материнской клетки, то учитываются обе клетки. Клетки, окрашенные в светло-голубой цвет, следует считать живыми.

5.5.6 Выражение результатов

Если Т - общее количество клеток, а С - количество клеток, окрашенных в синий цвет, то процент жизнеспособных клеток составляет:

$$\frac{T - C}{T} \text{x } 100$$

5.5.7 Библиография

European Brewery Convention. Analytica Microbiologica – EBC. Fachverlag Hans Carl, 2001

6. ПОДСЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТУРЫ

Цель:

Цель подсчета микроорганизмов по культуре – оценить уровень загрязнения образца, то есть оценить количество жизнеспособных микроорганизмов. В зависимости от используемой культуральной среды и условий культивирования можно подсчитать четыре типа микроорганизмов, а именно: дрожжи, молочные бактерии, уксуснокислые бактерии и плесень.

Сущность метода:

Пересчет по культурам основан на том, что микроорганизмы способны расти в питательной среде и условия инкубации подходят для образования колоний на среде, затвердевшем агаре или помутнениях в жидкой среде. На агаровой среде клетка путем пролиферации образует скопление клеток, видимое невооруженным глазом, называемое колонией.

6.1 Обнаружение, дифференциация и подсчет количества микроорганизмов (подсчет пластин).

6.1.1 Область применения

Настоящий стандарт дает общее руководство по подсчету жизнеспособных дрожжей, плесеней и молочнокислых или уксуснокислых бактерий в сусле, концентрированном сусле, частично сброженном сусле, винах (включая игристые вина) в процессе их производства и после розлива в бутылки путем подсчета колоний, выросших на твердой среде после соответствующей инкубации. Целью микробиологического анализа является контроль процесса виноделия и предотвращение микробной порчи сусла или вина.

6.1.2 Термины и определения
Термины «пластина» и «чашка Петри» используются как синонимы. КОЕ = колониеобразующие единицы.

6.1.3 Метод
Количество жизнеспособных микроорганизмов, присутствующих в сусле или вине, определяется путем нанесения определенного небольшого объема образца на поверхность питательной среды или добавления его в соответствии с стандартной процедурой (см. п. 6.1.7.4) и инкубирования пластин в течение необходимого времени в условиях, подходящих для роста микроорганизмов. Каждая клетка или скопление клеток делится, собирается в скопление и становится видимой в виде колонии. Количество колоний, обнаруженных на поверхности пластины, соответствует количеству клеток, присутствующих в исходном образце, поэтому результаты представляются в виде КОЕ. Если предполагается, что количество клеток в образце высокое, проводят соответствующие серийные десятикратные разведения для получения колоний в количестве от 10 до 300 на пластину. Если предполагается, что количество КОЕ в образце низкое, их собирают на поверхности стерильного фильтра (0,45–0,88 мкм для дрожжей и от 0,22 до 0,45 мкм для бактерий), который затем помещают в чашку Петри на поверхность питательной среды.
Диапазон измерений данного метода составляет от <1 КОЕ/(анализируемый объем) до 10^9 КОЕ/мл или 10^{10} КОЕ/г в исходном образце.

6.1.4 Реагенты и материалы
Как указано в пункте 1 резолюции, а также с дополнительными материалами:
-Пробирки (16x160 мм или аналогичные), содержащие 9 мл стерильной пептонной воды (Триптон: 1 г/л) или другие разбавители, которые будут используются для серийных разведений образцов (Приложение 4). Ниже приведено ориентировочное количество пробирок, необходимых для следующих образцов:
Неферментированное сусло: 4 на образец.
Ферментированное сусло: 7 на образец.
Вина на хранении: 2 на образец.
- Микропипетки со стерильными наконечниками: 1 мл и 0,2 мл.
- L-образные или треугольные изогнутые стеклянные стержни (шпатель Дригальского) или пластиковые распределители.

- Чашки Петри диаметром 90 мм (56 $см^2$) (с 15-20 мл питательной среды) для метода посева, и пластины диаметром 90 мм или 60 мм (с 6-8 мл питательной среды) для метода с использованием мембранных фильтров, заполненные за 18-24 ч 15-20 мл питательной среды (для каждого исследуемого образца необходимы простые или двойные чашки):
- Для подсчета количества дрожжей используют: солодово-дрожжевой агар, агар с дрожжевым экстрактом, питательный W.L. агар, или триптонно-дрожжевой агар с глюкозой. При поиске дрожжей, не относящихся к роду сахаромицетов, используют пластины с лизиновым агаром и дифференциальным WL агаром (Приложение 5, питательная среда) или эквивалент, если он одобрен.
- Для подсчета количества уксуснокислых бактерий используют: GYC агар, среды G2 или «Кнейфель» (Приложение 5, питательная среда), или эквивалент, если оп прошел проверку.
- Для подсчета количества молочнокислых бактерий используют: Агар MPC плюс 20% томатный, яблочный или виноградный сок, или модифицированный антибиотик агар (среда для Oenococcus oeni), или агар с добавлением томатного сока, или среду «Лафон-Лафуркад», среду 104 и МБТ-агар (Приложение 5: питательная среда), или эквивалент, если он прошел проверку.
- Для подсчета количества мицелиальных грибов используют модифицированный агар Чапека-Докса, агар с бенгальским розовым, дихлораном и хлорамфениколом, или с экстрактом солода с добавлением тетрациклина (100 мг/л) и стрептомицина (100 мг/л). (Приложение 5 питательная среда) или эквивалент, если он прошел валидацию.

Для того чтобы подсчет был селективным, добавляют антибиотики, так как в вине все микроорганизмы находятся вместе (см. Приложение I)

6.1.5 Установки и оборудование
Как указано в пункте 2 резолюции.

6.1.6 Отбор проб
Как указано в пункте 3 Резолюции
Для подсчета посева необходимы следующие объемы образцов: сусло, или бродильное сусло, или вино: не менее 250 мл;
Бутилированное или упакованное вино: не менее одной единицы, независимо от объема;

6.1.7 Проведение исследования

6.1.7.1 Предварительные требования

Все материалы и оборудование, используемые при проведении исследований, должны быть стерильными, во время всех операций необходимо соблюдать асептические условия.

За 5 минут до начала работы необходимо включить шкаф с ламинарным потоком, чтобы обеспечить стерильный и стабильный поток воздуха.

6.1.7.2 Стерилизация

Культуральные среды должны быть стерилизованы в автоклаве при температуре 121°C в течение не менее 15 минут (20 минут для больших объемов). Одноразовые стерильные материалы и стеклянная посуда должны открываться и использоваться в ламинарном шкафу. Перед использованием пинцеты и приспособления для распределения необходимо погрузить в этанол и прокалить. Воронки из нержавеющей стали должны помещаться в этанол и прокаливаться в после каждого использования, а стеклянные и поликарбонатные воронки должны стерилизоваться в автоклаве перед использованием, поэтому они должны быть доступны в том же количестве, что и исследуемые образцы.

6.1.7.3 Разбавление пробы (Приложение 1)

1 мл образца пипеткой переносят в стерильную пробирку с 9 мл пептонной воды. Пробирку перемешивают с помощью вихревого шейкера в течение 20 секунд. Из данного первого (десятикратного) разведения 1 мл переносится в следующую 9-мл стерильную пробирку с пептонной водой, что будет считаться вторым разведением. После 20-секундного встряхивания при необходимости операцию повторяют.

Ниже приводится ориентировочное количество серийных разведений, необходимых для следующих образцов:

Несброженное сусло: 4 десятикратных разведения.

Сброженное сусло: 7 десятикратных разведений.

Нефильтрованные вина во время выдержки (количество дрожжей): 2 десятикратных разведения.

Нефильтрованные вина во время выдержки (количество молочнокислых бактерий): 6 десятикратных разведений.

Фильтрованные вина или упакованные (бутилированные) вина: Не разбавляют.

Концентрированные сусла: Разведение10 мл в 100 мл пептонной воды (или 100 мл в 1000 мл).

Бутилированные или фильтрованные вина, а также концентрированные сусла после разбавления в стерильной пептонной воде анализируют с помощью метода мембранных фильтров.

6.1.7.4 Посев

Необходимые серийные разведения готовятся с учетом количества образцов, которые должны быть помещены в чашки. Можно приготовить несколько серийных разведений, если необходимо инокулировать много образцов, но любое разведение должно быть инокулировано в течение 20 минут.

В каждую чашку инокулируют 0,1 или 0,2 мл трех наименьших разведений, приготовленных следующим образом:

Неферментированное сусло разбавления -2; -3; -4.

Ферментированное сусло разбавления-5; -6; -7.

Нефильтрованные вина в процессе созревания разбавления 0; -1; -2.

В случае сомнений необходимо проводить инокуляцию большим числом разведений, но не меньшим.

В асептических условиях (предпочтительно в шкафу с ламинарным потоком) образец наносят на поверхность питательной среды до впитывания жидкости (обычно в течение 1 - 2 минут) стерильной изогнутой стеклянной палочкой (шпателем Дригальского) или одноразовой палочкой. Для каждой пластины должен использоваться отдельный шпатель в форме хоккейной клюшки, или же пластины должны быть разложены, начиная с наиболее разбавленного образца и переходя к наименее разбавленным. Пластины оставляют на несколько минут под потоком стерильного воздуха, пока жидкость не впитается.

Примечание 1: Введение 0,2 мл вместо 0,1 мл, как часто указывается, обеспечивает более легкое распространение и увеличивает срок использования. При расчетах это необходимо учитывать.

Примечание 2: Для подсчета дрожжей рост бактерий предотвращают путем добавления 50 мг/л хлорамфеникола (или эквивалента, если он соответствует требованиям) к питательной среде после ее стерилизации в автоклаве, рост плесени - путем

добавления дифенила 150 мг/л (или эквивалента, если он соответствует требованиям).

Примечание 3: Для определения количества молочнокислых бактерий, рост дрожжей предотвращают добавлением натамицина (пимарицина) (0,1 г/л) (или эквивалента, если он соответствует требованиям), рост уксуснокислых бактерий блокируют анаэробной инкубацией.

Примечание 4: Для определения количества уксуснокислых бактерий рост дрожжей предотвращается добавлением натамицина (пимарицина) (0,1 г/л) (или эквивалента, если он соответствует требованиям), рост молочнокислых бактерий предотвращается добавлением пенициллина (12,5 мг/л) (или эквивалента, если он соответствует требованиям). Добавление антибиотиков производится после стерилизации в автоклаве.

Если проводится специфическое исследование дрожжей, не относящихся к *Saccharomyces*, проводят инокуляцию, как описано ранее, трех пластин с лизиновым агаром и трех пластин с дифференциальным WL агаром соответствующими разведениями:

- Стандартный метод (альтернативный метод).
Подготавливают и стерилизуют 15 мл среды в пробирках и держат пробирки на водяной бане (эквиваленте, если советует требованиям) при температуре 47±1 °C.
Наливают 1 мл образца или разведения в пустую чашку Петри.
Добавляют 15 мл питательной среды и осторожно перемешивают чашку Петри, чтобы получить однородное распределение микроорганизмов в массе среды.
Дают остыть и затвердеть, поместив чашки Петри на прохладную горизонтальную поверхность (время застывания агара не должно превышать 10 минут).

6.1.7.5 Подсчет с концентрацией путем мембранной фильтрации
Пористость мембраны должна быть 0,45 или 0,8 мкм для подсчета дрожжей; 0,2 или 0,45 мкм для подсчета бактерий. Поверхность мембраны должна быть предпочтительно сетчатой, чтобы облегчить подсчет колоний. Пластины, на которые помещают мембраны, могут содержать агаровую питательную среду или подушечку, в которой разбросана сухая среда,

которую необходимо смочить стерильной водой непосредственно перед использованием. Некоторые поставщики предоставляют стерильные пластины, содержащие стерильную подушечку, на которую непосредственно перед использованием наливают содержимое 2 мл одноразовой стерильной жидкой среды.

Фльтрационное оборудование собирают в асептических условиях, стерилизуют воронку в соответствии с п. 9.2 и подключают к вакуум-производящей системе.

Окунают пинцет в этанол и поджигают его: когда пламя погаснет, через несколько секунд кладут мембрану с пинцетом на держатель фильтрационной установки.

Перед тем как открыть бутылку, хорошо встряхивают ее; окунают затем горлышко бутылки вверх дном в этанол (1-2 см), затем в пламя для стерилизации.

Из каждого образца отбирают три объема: 10 мл стерильной 10-мл пипеткой, 100 мл стерильной цилиндрической пипеткой на 100 мл, а остальное, по возможности, прямо из бутылки. Чтобы профильтровать вино, его пропускают через воронку.

Когда нужное количество вина будет отфильтровано, выключают вакуум, сжимают пинцет, открывают воронку и, удерживая мембрану пинцетом, кладут ее на противоположный край на твердую среду тарелки, позволяя ей прилипнуть к поверхности среды, избегая образования пузырьков под ней.

6.1.7.6 Инкубация пробы

Пластину инкубируют в перевернутом виде 4 дня при температуре 25 ± 2 °C для дрожжей или для уксуснокислых бактерий. Если температура < 23 °C, инкубацию продлевают еще на один день, если температура < 20 °C – еще на три дня. Максимальная температура не должна превышать 28 °C.

В случае проведения подсчета дрожжей *Brettanomyces* (или *Dekkera*), увеличивают время инкубации в два раза.

Для проведения подсчета молочнокислых бактерий помещают пластины в анаэробную банку или пакет и инкубируют пластины в перевернутом виде 10 дней при температуре 30 ± 2 °C. Если температура < 28 °C, продлевают инкубацию еще на один день, если < 25 °C – еще на три дня. Максимальная температура не должна превышать 33 °C.

6.1.8 Выражение результатов

6.1.8.1 Подсчет колоний дрожжей и бактерий.

Подсчитывают колонии, выросшие за 4 дня для дрожжей и уксуснокислых бактерий (8 дней для дрожжей *Brettanomyces/Dekkera*) и

10 дней для молочнокислых бактерий, при необходимости с помощью счетчика колоний, игнорируя различную морфологию колоний при проведении общего подсчета дрожжей, или учитывая ее, если это необходимо.

Среда и условия инкубации достаточно специфичны, чтобы можно было подсчитать различные типы микроорганизмов в колониях, видимых невооруженным глазом.

6.1.8.2 Подсчет результатов.

Наиболее надежные результаты дает подсчет посевов, содержащих от 10 до 300 колоний (ISO 7218:2007 - Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных – Общие правила микробиологических исследований).

Рассчитывают количество N микроорганизмов, присутствующих в исследуемом образце, как средневзвешенное значение из двух последовательных разведений, используя следующее уравнение:

$$N = \frac{\sum \mathrm{C}}{V \times 1{,}1 \times d}$$

где: $\sum C$ - сумма колоний, подсчитанных на двух чашках, оставленных после двух последовательных разведений, по крайней мере, одна из которых содержит не менее 10 колоний.

V - объем инокулята, помещенного в каждую посуду, в миллилитрах.

d - разведение, соответствующее первому сохраненному разведению [d=1, если сохраняется неразбавленный жидкий продукт (контрольный образец)].

Другими словами, если пластины из двух последовательных десятикратных разведений содержат 10-300 колоний, количество КОЕ/мл рассчитывается для каждого разведения, а затем среднее из двух значений: это и есть значение КОЕ/мл образца. Если одно значение больше удвоенного другого, сохраняется меньшее значение как КОЕ/мл.

Результаты округляются до двух значащих цифр только при пересчете в КОЕ/мл и выражаются в виде числа от 1,0 до 9,9, возведённого в соответствующую десятичную степень (ISO 7218:2007 – Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных - Общие правила микробиологических исследований).

Если образцы были инокулированы в двух сериях, и одна или две пластины, инокулированные одним и тем же разведением, содержат колонии, вычисляется среднее число колоний и умножается на обратную величину коэффициента разведения для получения количество КОЕ/мл.

Если нет ни одной пластины, содержащей 10-300 колоний, и все пластины содержат более 300 колоний, идет подсчет менее переполненных. Если они содержат менее 10 колоний/см², подсчитывают 12 квадратов площадью 1 $см^2$ и умножают среднее значение на 56 (площадь чашки диаметром 90 мм); если колонии более плотные, подсчитывают 4 квадрата площадью 1 $см^2$ и умножают среднее значение на 56. Результаты выражаются как «Расчетное количество КОЕ/мл». По возможности не рекомендуется выражать результаты как «сплошной рост».
Если одна пластина, содержащая колонии, содержит менее 10 колоний, но не менее 4, результат рассчитывается, как указано в общем примере и выражается как «Расчетное количество КОЕ/мл».
Если общее количество составляет от 3 до 1, точность результата слишком низкая, и результат должен быть представлен как «искомые микроорганизмы присутствуют, но менее 4 × d КОЕ/мл».
Если на пластинах всех разведений любого образца нет колоний, результаты выражаются как «менее 1/d КОЕ/мл», однако необходимо учитывать возможное присутствие ингибиторов в образце.
При проведении метода мембранной фильтрации результаты выражаются в зависимости от количества отфильтрованной жидкости, например, КОЕ/тара, КОЕ/100 мл или КОЕ/10 мл.

6.1.9 Погрешность измерения
6.1.9.1 Критерии контроля результатов.
Для каждой партии среды одна пластина используется в качестве контроля стерильности после стерилизации. Одна пластина для каждой питательной среды, используемой во время испытаний, остается открытой в ламинарном шкафу во время всех операций для контроля стерильности рабочей среды. Эта пластина будет инкубироваться как засеянная.
Периодически один образец инокулируют в двойном количестве, и экспериментальный Kp рассчитывается по следующему уравнению:

$$Kp = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{C_1 + C_2}}$$

где C_1 и C_2 это результаты двух измерений.
Если Kp < 1,96 ≈2,0, результаты являются удовлетворительными: среднее значение двух измерений может быть использовано в качестве результата.

Если 2,0< Kp ≤ 2,576 ≈ 2,6, разница двух измерений является критической и должна быть тщательно оценена перед принятием результатов в качестве среднего из двух отчетов.
Если Kp > 2,6, разница двух измерений является неудовлетворительной. Результат отклоняется, и тест должен быть повторен. В этом случае ответственное лицо лаборатории должно изучить все результаты, полученные после последних удовлетворительных результатов.

6.1.9.2 Погрешность измерения
Если число подсчитанных колоний в счетной пластине меньше 10, результат является удовлетворительным, но считается, что популяция колоний следует распределению Пуассона. В следующей таблице представлен 95% уровень доверия с погрешностью измерения оценочного подсчета, выполненного на одной чашке Петри.

Номер	Доверительный интервал на уровне 95%		Процентная погрешность предела*	
	Нижний	Верхний	Нижний	Верхний
1	<1	6	-97	457
2	<1	7	-88	261
3	<1	9	-79	192
4	1	10	-73	156
5	2	12	-68	133
6	2	13	-63	118
7	3	14	-60	106
8	3	16	-57	97
9	4	17	-54	90
10	5	18	-52	84
11	6	20	-50	79
12	6	21	-48	75
13	7	22	-47	71
14	8	24	-45	68
15	8	25	-44	65
* По сравнению с подсчетом микроорганизмов (1-я колонка)				

Если количество колоний >10, доверительный интервал при уровне вероятности p рассчитывается с помощью следующего уравнения:

$$C = C_i \pm K_p\sqrt{C_i}$$

где C_i число колоний на пластине и K_p - коэффициент охвата.
Обычно коэффициент охвата равен 2, или 1,96. Значение C рассчитывается по каждой пластине и умножается на количество разведений, вместе с результатом подсчета.

6.2. Культура в жидкой среде – «наиболее вероятное число» (НВЧ)

6.2.1 Цель

Цель данного метода – оценить количество жизнеспособных микроорганизмов в винах с высоким содержанием твердых частиц во взвеси и/или высокой частотой образования пробок.

6.2.2 Сущность метода

Этот метод основан на оценке количества жизнеспособных микроорганизмов в жидкой среде, исходя из принципа их нормального распределения в образце.

6.2.3 Разбавители и жидкие питательные среды (см. Приложения 4 и 5)

6.2.4 Проведение исследования

Готовятся несколько количественных и последовательных растворов. После инкубации определенная часть тестов не будет иметь роста (отрицательные тесты), в то время как другие тесты выявят рост (положительные тесты). Если образец и разведения являются однородными, и если количество разведений достаточно, возможно обработать результаты статистически, используя для этого соответствующие таблицы (таблицы, основанные на расчетах вероятности МакКриди), и экстраполировать результат на исходный образец

6.2.5 Приготовление растворов

Начиная с образца гомогенизированного вина, проводится серия десятикратных разведений (1/10) в разбавителе.

1 мл вина добавляют к 9 мл разбавителя в первой пробирке. Гомогенизируют. 1 мл данного разведения добавляют к 9 мл разбавителя во второй пробирке. Протокол разведения ведут до последнего требуемого разведения в соответствии с предполагаемой микробной популяцией с использованием стерильных пипеток для каждого разведения. Разведения должны проводиться до полного исчезновения, т.е. отсутствия роста в малейших разведениях (приложение 2).

6.2.6 Подготовка посева

Инокулируют 1 мл вина и 1 мл каждого из приготовленных разведений в 3 пробирки с соответствующей питательной средой (приложение 5). Тщательно перемешивают.

Инкубируют засеянные пробирки в инкубаторе при 25°C для дрожжей 3 дня и до 10 дней в аэробных условиях; для молочных бактерий 8 дней в анаэробных и до 10 дней в микроаэрофильных условиях, проводя периодические наблюдения вплоть до последнего дня инкубации.

6.2.7 Результаты

Все пробирки, в которых наблюдается развитие микроорганизмов, приводящее к образованию беловатого осадка, более или менее явного и/или с более или менее выраженными нарушениями, считаются положительными. Результаты должны быть подтверждены наблюдением через микроскоп. Указывают инкубационный период.

Подсчет пробирок проводят, отмечая количество положительных или отрицательных пробирок в каждой комбинации из трех пробирок (в каждом разведении). Например, «3-1-0» означает: 3 положительные пробирки в разведении 10^0 (вино), 1 в разведении 10^{-1} и ноль в разведении 10^{-2}.

При числе разведений, превышающем 3, только 3 из этих результатов являются значимыми. Для отбора результатов, позволяющих определить «НВЧ», необходимо определить «вероятное число» в соответствии с примерами, приведенными в следующей таблице:

Таблица:

Количество положительных пробирок для каждого разведения						Стандартное количество
Пример	10	10	10	10	10	3-1-0
a	3	3	3	1	0	3-2-0
a	3	3	2	0	0	3-2-1
a	3	2	1	0	0	3-0-1
a	3	0	1	0	0	3-2-3
b	3	2	2	1	0	3-2-3
b	3	2	1	1	0	3-2-2
c	2	2	2	2	0	2-2-2
d	0	1	0	0	0	0-1-0

Пример a: включают наибольшее разведение, в котором все пробирки положительны, и два последующих.

Пример b: если положительный результат получен для разведения, которое больше, чем последнее выбранное разведение, его включают.

Пример c: если ни одно разведение не достигает трех положительных пробирок, включают разведения, соответствующие трем последним положительным пробиркам.

Пример d: в случае очень малого числа положительных пробирок вероятное число выбирают так, чтобы положительное разведение находилось в ряду десяток.

Источник: Bourgeois, C.M. and Malcoste, R. in: Bourgeois, C.M. and Leveau, J.Y. (1991).

Расчет наиболее вероятного числа (НВЧ)

Учитывая полученное вероятное число, НВЧ определяется по таблице A (Приложение 3) на основе расчетов вероятности МакКриди с учетом сделанного разведения. Если серия разбавлений составляет 10^0; 10^{-1}; 10^{-2}, то показания являются прямыми. Если серия разбавления составляет 10^1; 10^0; 10^{-1}, то показания в 0,1 раза больше этого значения. Если серия разбавления составляет 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}, то показания в 10 раз больше этого значения.

Примечание:

Если есть необходимость повысить чувствительность, можно использовать концентрацию 10^1 в вине. Для получения данной концентрации микроорганизмов в 1 мл, центрифугируют 10 мл вина,

берут 1 мл осадка (после того, как отберут 9 мл избыточной жидкости) и инокулируют в соответствии с ранее описанным методом.

6.2.8 Выражение результатов

Содержание микроорганизмов в вине должно быть выражено в клетках на мл, в научной системе с точностью до одного десятичного знака. Если содержание ниже 1,0 клеток/мл, результат должен быть представлен как «<1,0 клеток/мл».

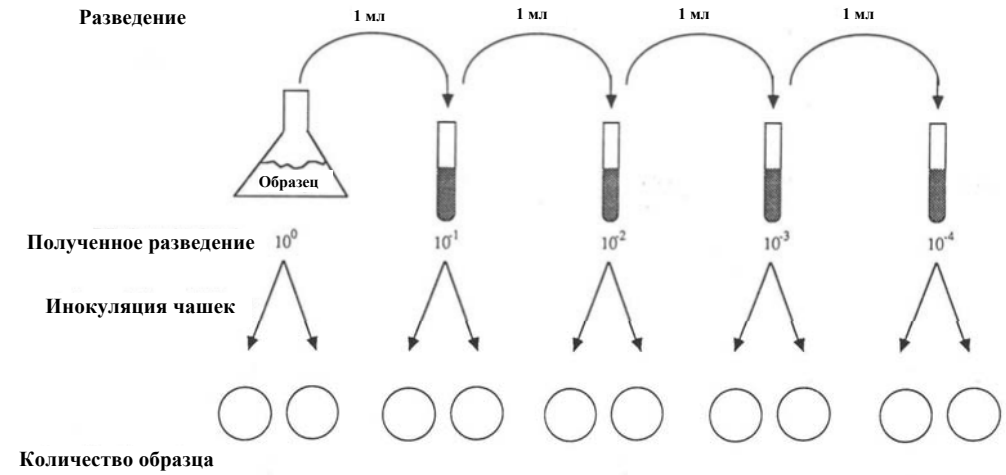
(См. приложения на следующих страницах)

7. БИБЛИОГРАФИЯ

- ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal medium for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C.
- ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuff - General rules for microbiological examinations.
- ISO 7667:1983. Microbiology - Standard layout for methods of microbiological examination.
- Pallman, C., J. B. Brown, T. L. Olineka, L. Cocolin, D. A. Mills and L. F. Bisson. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 52:198-203;
- A. Cavazza, M. S. Grando, C. Zini, 1992. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. Vignevini, 9-1992 17-20.- ANDREWS, W. et MESSER, J. (1990). Microbiological Methods. in : AOAC Official Methods of Analysis, 15th edition, 1, 425-497, Association of Analytical Chemist, Washington.
- BIDAN, P. (1992). Analyses Microbiologiques du Vin. F.V. O.I.V. nº 910, Paris.
- BOURGEOIS, C.M. et LEVEAU, J.Y. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires, 2ème édition, 3. Le Contrôle Microbiologique Lavoisier, Tec. & Doc., APRIA Ed. Paris.
- CARR, J.G. (1959). Acetic acid bacteria in ciders. Ann.Rep. Long Ashton Res.Sta., 160.
- DE MAN, J. C. (1975). The probability of most probable number. European Journal of Applied Microbiology, 1, 67-78.
- LAFON-LAFOURCADE, S. et al. (1980). Quelques observations sur la formation d'acide acétique par les bactéries lactiques. Conn. Vigne Vin, 14, 3, 183-194.
- MAUGENET, J. (1962). Les Acétobacter du cidre. Identification de quelques souches. An. Technol. Agric., 11, 1, 45-53.
- PLARIDIS et LAFON-LAFOURCADE, S. (1983). Contrôle microbiologique des vins. Bull. O.I.V., 618, 433-437, Paris.
- RIBÉREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, E. (2004). Traité d'Oenologie, Tome
2, Librairie Polytechnique CH. Béranger, Paris et
Liège.
- Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1976). 14th edition, American Public Health Association, Incorporated, New York.
- Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1985). 16th edition, American Public Health Association, DC 20005, Washington.
- VAZ OLIVEIRA, M., BARROS, P. et LOUREIRO, V. (1995). Analyse microbiologique du vin. Technique des tubes multiples pour l'énumération de micro-organismes dans les vins - "Nombre le plus probable" (NPP), F.V. O.I.V. nº 987, Paris.
- VAZ OLIVEIRA, M.et LOUREIRO, V.(1993). L'énumération de micro-organismes dans les vins ayant un indice de colmatage élevé, Compte rendu des travaux du groupe d'experts "Microbiologie du Vin" de l'O.I.V., 12ème session, annexe 2, Paris.
- VAZ OLIVEIRA, M. et LOUREIRO, V. (1993). L'énumération de micro-organismes dans les vins ayant un indice de colmatage élevé, 2ème partie, Doc. Travail du groupe d'experts "Microbiologie du Vin" de l'O.I.V., 13ème session, Paris.

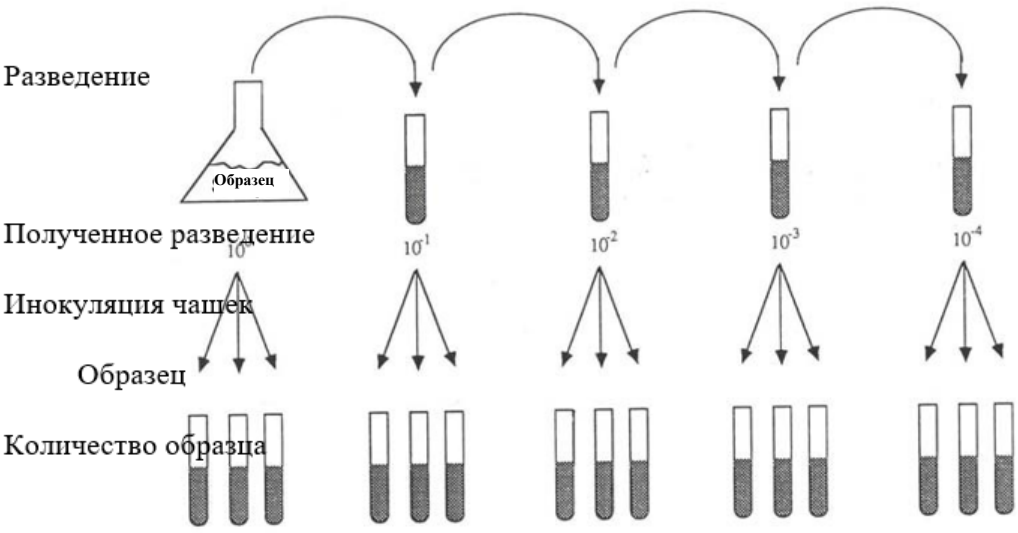
Приложение 1

Подготовка разведений и инокуляций



Приложение 2

Подготовка разведений и инокуляций



Приложение 3

ТАБЛИЦА А

«Наиболее вероятное число» (НВЧ) для 1 мл образца с использованием 3 пробирок с 1 мл, 0,1 мл и 0,01 мл

Положительные пробирки				Положительные пробирки				Положительные пробирки			
1 мл	0,1 мл	0,01 мл	НВЧ 1 мл	1 мл	0,1 мл	0,01 мл	НВЧ 1 мл	1 мл	0.1 мл	0,01 мл	НВЧ 1 мл
0	0	0	0,0	2	0	2	2,0	1	1	1	7,5
0	0	1	0,3	2	1	0	1,5	3	1	2	11,5
0	1	0	0,3	2	1	1	2,0	3	1	3	16,0
0	1	1	0,6	2	1	2	3,0	3	2	0	9,5
0	2	0	0,6	2	2	0	2,0	3	2	1	15,0
1	0	0	0,4	2	2	1	3,0	3	2	2	20,0
1	0	1	0,7	2	2	2	3,5	3	2	3	30,0
1	0	2	1,1	2	2	3	4,0	3	3	0	25,0
1	1	0	0,7	2	3	0	3,0	3	3	1	45,0
1	1	1	1,1	2	3	1	3,5	3	3	2	110,0
1	2	0	1,1	2	3	2	4,0	3	3	3	>140,0
1	2	1	1,5	3	0	0	2,5				
1	3	0	1,6	3	0	1	4,0				
2	0	0	0,9	3	0	2	6,5				
2	0	1	1,4	3	1	0	4,5				

Взято из «Стандартных методов исследования воды и сточных вод» (1976 г.)

Приложение 4

Разбавители:
Разбавители указаны в качестве примера. Используемая вода должна быть дистиллированной, бидистиллированной или деионизированной, без следов металлов, ингибиторов или других антимикробных веществ.

1. Физиологическая вода
Подготовка: взвешивают 8,5 г хлорида натрия в мерной колбе объемом 1000 мл. После того как он растворится в воде, устанавливают эталонный объем. Тщательно перемешивают. Фильтруют. Распределяют по 9 мл в пробирки. Закупоривают ватой и стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин при 121 °C.

2. 1/4 раствор Рингера
Приготовление: взвешивают 2,25 г хлорида натрия, 0,105 г хлорида калия, 0,120 г хлорида кальция ($CaCl_2.6H_2O$) и 0,05 г гидрокарбоната натрия в мерной колбе емкостью 1000 мл. После растворения в воде доводят до метки. Тщательно перемешивают. Распределяют по 9 мл в пробирки. Закупоривают ватой и стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при 121°C. (Данный раствор доступен в продаже)

3. Пептоновая вода
Подготовка: взвешивают 1 г пептона в калиброванной колбе объемом 1000 мл. После того как он растворится в воде, устанавливают эталонный объем. Тщательно перемешивают. Распределяют по 9 мл в пробирки. Закупоривают ватой и стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин при 121°C.

Приложение 5

Питательная среда

Питательные среды и противомикробные препараты указаны в качестве примера.

Используемая вода должна быть дистиллированной, дважды дистиллированной или деионизированной без следов металлов, ингибиторов или других антимикробных веществ.

1. Твердая питательная среда

Если не указано иное, уровень pH всех сред должен быть отрегулирован до pH 5,5-6,0

1 СРЕДА ДЛЯ ПОДСЧЕТА КОЛИЧЕСТВА ДРОЖЖЕЙ

1.1 Дрожжи солодовые

Глюкоза	50 г
Пептон	5 г
Дрожжевой экстракт	3 г
Экстракт солода	3 г
Агар-агар	20 г
Вода: до	1000 мл

При необходимости добавляют 100 мг хлорамфеникола для подавления роста бактерий и 150 мг дифенила для подавления роста плесени.

1.2 Дрожжевой экстракт пептон декстроза

Глюкоза	20 г
Пептон	20 г
Дрожжевой экстракт	10 г
Дрожжевой экстракт	20 г
Вода: до	1000 мл

При необходимости добавляют 100 мг хлорамфеникола для подавления роста бактерий и 150 мг дифенила для подавления роста плесени.

1.3 Агар питательный

Глюкоза	50 г
Пептон	5 г
Дрожжевой экстракт	4 г
Калий фосфат монобазовый (KH_2PO_4)	0.55 г
Хлорид калия (KCl)	0.425 г
Хлорид кальция ($CaCl_2$)	0.125 г
Сульфат магния ($MgSO_4$)	0.125 г
Хлорид железа ($FeCl_3$)	0.0025 г
Сульфат марганца ($MnSO_4$)	0.0025 г
Бромкрезол зелёный	0.022 г
Агар бактериологический	12 г
Вода: до	1000 мл
pH	5.5

Дифференциальный WL агар изготавливается путем добавления 4 мг/л циклогексимида к питательному WL агару.

При необходимости добавляют 100 мг хлорамфеникола для подавления роста бактерий.

1.4 Лизиновый агар ASBC

Раствор А:

Дрожжевая углеродная основа	2.35 г
Вода: до	100 мл

Стерилизация путем мембранной фильтрации.

Раствор Б:

Лизин -HCl	0.5 г

Агар-агар	4 г
Вода: до	100 мл

Стерилизация в течение 20 мин. При температуре 121°C.
При необходимости добавляют 100 мг хлорамфеникола для подавления роста бактерий.

2 СРЕДА ДЛЯ ПОДСЧЕТА КОЛИЧЕСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

2.1 M.P.C. + томатный (или яблочный) сок.

Глюкоза	20 г
Пептон	10 г
Экстракт говядины	8 г
Экстракт дрожжей	4 г
Фосфат калия, дибазид (KH_2PO_4)	2 г
Ацетат натрия $\cdot 3H_2O$	5 г
Ацетат натрия	2 г
Сульфат магния $\cdot 6H_2O$	0.2 г
Сульфат марганца $\cdot 4H_2O$	0.05 г
«Полисорбат-80»	1 мл
Агар-агар	12 г
Томатный (яблочный, виноградный) сок	200 мл
Вода до	1000 мл

Добавляют 100 мг/л натамицина (пимарицина) для подавления роста дрожжей, после стерилизации в автоклаве, непосредственно перед использованием.

2.2 Агар из томатного сока

Томатный сок (сухой экстракт из 400 мл)	20 г
Пептон	10 г
Пептонизированное молоко	10 г
Агар-агар	14 г
Вода	1000 мл
pH	6.1

Добавляют 100 мг/л натамицина (пимарицина) для подавления роста дрожжей, после стерилизации в автоклаве, непосредственно перед использованием.

2.3 Модифицированная среда ATB, или среда Oenococcus oeni (ранее среда Leuconostoc oenos).

Раствор A:

Глюкоза	10 г
Экстракт дрожжей	5 г
Пептон	10 г
Сульфат магния	0.2 г
Сульфат марганца	0.050 г
Томатный сок (или яблочный сок, или виноградный сок)	250 мл
Агар-агар	12 г
Вода	750 мл

Стерилизуют в автоклаве 20 мин. при 121 °C.

Раствор Б:

Цистеин HCl	1 г
Вода: до	100 мл
pH	4.8

Стерилизация путем мембранной фильтрации.
Добавляют 100 мг/л натамицина (пимарицина) для подавления роста дрожжей, непосредственно перед использованием.

Добавляют 1 мл раствора Б к 20 мл раствора А в момент использования

2.4 среда «Лафон-Лафуркад»

Глюкоза	20 г
Экстракт дрожжей	5 г
Экстракт говядины	10 г
Пептон	10 г
Ацетат натрия	5 г
Цитрат три-аммония	2 г
Сульфат магния $\cdot 6H_2O$	0,2 г
Сульфат марганца $\cdot 4H_2O$	0,05 г
«Полисорбат-80»	1 мл
Агар-агар	20 г
Вода: до	1000 мл
pH	5,4

Добавляют 100 мг/л натамицина (пимарицина) для подавления роста дрожжей, после стерилизации в автоклаве, непосредственно перед использованием.

2.5 Среда Дюбуа (среда № 104)

Томатный сок	250 мл
Дрожжевой экстракт	5 г

Пептон	5 г
Яблочная кислота	3 г
Сульфат магния · $6H_2O$	0,05 г
Сульфат марганца · $4H_2O$	0,05 г
Агар-агар	20 г
Вода: до	1000 мл
pH	4,8

Добавляют 100 мг/л натамицина (пимарицина) для подавления роста дрожжей, после стерилизации в автоклаве, непосредственно перед использованием.

2.6 МТБ.

Глюкоза	15 г
Порошок Lab-Lemco (Oxoid)	8 г
Гидролизованный казеин	1 г
Дрожжевой экстракт	5 г
Томатный сок	20 мл
Ацетат натрия	3 г
Цитрат аммония	2 г
Яблочная кислота	6 г
Сульфат магния	0,2 г
Сульфат марганца	0,035 г
«Полисорбат-80»	1 мг
ТС Витаминный комплекс Eagle, 100x (BD-Difco)	10 мл*
pH (с KOH)	5,0
Вода до	1000 мл

* добавляется после стерилизации.

100 мг/л натамицина (пимарицина) добавляют для подавления роста дрожжей, после стерилизации в автоклаве, непосредственно перед использованием.

3 СРЕДЫ ДЛЯ ПОДСЧЕТА УКСУСНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

3.1 Среда GYC

Глюкоза 50 г	
Дрожжевой экстракт	10 г
Карбонат кальция ($CaCO_3$)	30 г
Агар	25 г
Вода: до	1000 мл

Добавляют 100 мг / л натамицина (пимарицина) для подавления роста дрожжей и 12,5 мг/л пенициллина для уничтожения роста молочнокислых

бактерий, после стерилизации в автоклаве, непосредственно перед использованием.

3.2 Среда G2

Дрожжевой экстракт	1,2 г
Фосфат аммония	2 г
Яблочный сок	500 мл
Агар	20 г
Вода: до	1000 мл
pH	5,0

Непосредственно перед использованием добавляют 100 мг/л натамицина (пимарицина) для подавления роста дрожжей и 12,5 мг/л пенициллина для уничтожения роста молочнокислых бактерий после стерилизации в автоклаве.

3.3 Среда Кнайфеля

Дрожжевой экстракт	30 г
Этанол	20 мл*
Агар	20 г
Бромкрезоловый зеленый 2,2%	1 мл
Вода: до	1000 мл

* добавляется после стерилизации.

Добавляют 100 мг/л натамицина (пимарицина) для подавления роста дрожжей и 12,5 мг/л пенициллина для уничтожения роста молочнокислых бактерий после стерилизации в автоклаве, непосредственно перед использованием.

Синие колонии: Acetobacter, Gluconacetobacter

Зеленые колонии: Gluconobacter

4 СРЕДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛЕСЕНИ

4.1 Агар Чапека-Докса, модифицированный

Сукроза	30 г
$NaNO_3$	3 г
K_2HPO_4	1 г
$MgSO_4$	0,5 г
KCl	0,5 г
$FeSO_4$	0,01 г
Агар	15 г
Конечный pH (при 25°C)	7,3 ± 0,2

Добавляют 10 мг/л циклогексимида для подавления роста дрожжей (рост дрожжей, устойчивых к циклогексимиду, обычно медленнее, чем рост плесени).

Примечание: Эта среда позволяет расти только нитратообразующим плесеням.
Для подавления роста бактерий добавляют тетрациклин (100 мг/л) и стрептомицин (100 мг/л).

4.2 Агар с бенгальским розовым, дихлораном и хлорамфениколом (DRBC Агар)

Глюкоза	10 г
Пептон	5 г
KH_2PO_4	1 г
$MgSO_4$	0,5 г
Бенгальский розовый	0,025 г
Дихлоран (2,6 дихлор-4-нитроанилин)	0,002 г
Раствор хлорамфеникола	(0,1 г/10 мл)* 10 мл
Агар	15 г
Конечный pH (при 25°C)	5,6 ± 0,2

* Добавляется после стерилизации.

4.3 Агар для солодового экстракта (MEA)

Глюкоза	20 г
Солодовый экстракт	20 г
Пептон	5 г
Агар	15 г
Конечный pH (при 25°C)	5,5 ± 0,2

Тетрациклин (100 мг/л) и стрептомицин (100 мг/л) добавляются для подавления роста бактерий.

2. Жидкие питательные среды

2.1. **Для дрожжей**

Среда YEPD (дрожжевой экстракт, пептон, декстроза) + хлорамфеникол

Приготовление: взвешивают 10,0 г дрожжевого экстракта (Difco или эквивалент), 20 г пептона, 20 г глюкозы и 100 мг хлорамфеникола. Растворяют, разводят до объема 1000 мл водой и перемешивают.

Распределяют порциями по 5 мл эту рабочую среду в пробирки и стерилизуют в автоклаве в течение 15 минут при 121°C.

2.2. *Для молочнокислых бактерий*

Среда MTJ (50% среды MPC «Среда молочнокислых бактерий по Ману, Рогозе и Шарпу» + 50% среды TJB «Среда с томатным соком»)
+ актидион

Приготовление: взвешивают 27,5 г MPC «Среда молочнокислых бактерий по Ману, Рогозе и Шарпу» (Difco или эквивалент). Добавляют 500 мл воды, нагревают до кипения для полного растворения и добавляют 20,5 г TJB «Среда с томатным соком». Добавляют 50 г актидиона. Разводят водой, для получения 1000 мл раствора, предварительно скорректировав pH до 5 с помощью 1N соляной кислоты, затем перемешивают.

Распределяют среду[3] порциями по 10 мл в пробирки и стерилизуют в автоклаве в течение 15 минут при температуре 121 °C.

3) По причине большей чувствительности молочных бактерий к кислороду используется объем 10 мл, а не 5 мл, аналогично при работе с дрожжами.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6: ОБНАРУЖЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

6.1 Распознавание колоний дрожжей на питательном WL агаре.

Использование этой среды не является методом распознавания видов, но позволяет предложить неспециализированным лабораториям быстрый и дешевый способ определения рода жизнеспособных и культивируемых дрожжей. После 4-дневной инкубации оценивают морфологию колоний следующим образом (Pallman, C., J. B. Brown, T. L. Olineka, L. Cocolin, D. A. Mills and L. F. Bisson. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 52:198-203; A. Cavazza, M. S. Grando, C. Zini, 1992. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. Vignevini, 9-1992 17-20):

- ***Saccharomyces spp.:*** колонии хорошо растут в течение 4 дней на питательном WL агаре, образуя круглые колонии от кремового до бледно-зеленоватого цвета. Различные цветовые оттенки не всегда свидетельствуют о присутствии различных штаммов, но свидетельствуют о наличии мелких мутаций; поверхность гладкая и тусклая, консистенция маслянистая. Не растет на лизиновом агаре.
- ***Torulaspora spp***.: колонии похожи на колонии *Saccharomyces spp*. Растет на лизиновом агаре.
- ***Hanseniaspora spp. (Kloeckera spp.):*** вырастает на питательном WL агаре за 4 дня, давая темно-зеленые плоские, гладкие и маслянистые колонии. Растет на лизиновом агаре и на дифференциальном WL агаре.
- ***Candida stellata*.:** вырастает на питательном агаре WL за 4 дня, дает горохово-зеленые, гладкие и маслянистые колонии, с возрастом темнеющие в центре. Растет на лизиновом агаре.
- ***Saccharomycodes spp.:*** вырастает на питательном WL агаре через 4 дня, давая светло-зеленые, гладкие и маслянистые выпуклые колонии. Растет на лизиновом агаре, но не на дифференциальном WL агаре.

Примечание: при рассмотрении под микроскопом клетки этого вида очень крупные (до 25 нм).

- ***Schizosaccharomyces pombe:*** вырастает на питательном WL агаре за 4 дня, давая темно-зеленые точечные гладкие колонии. Растет на лизиновом агаре.

Примечание: клетки этого вида под микроскопом легко распознать из-за характерного деления.

- ***Rhodotorula spp.:*** вырастает на питательном WL агаре за 4 дня, давая темно-розовые, гладкие, маслянистые колонии со слизистой поверхностью. Растет на лизиновом агаре.

- ***Metschnikowia spp.:*** вырастает на питательном WL агаре за 4 дня, давая прозрачные, гладкие и небольшие маслянистые колонии. Красноватый пигмент распространяется в среде ниже колоний. Растет на лизиновом агаре.
- ***Pichia membranifaciens:*** растет на питательном WL агаре за 4 дня, давая сероватые или голубоватые шероховатые и мучнистые выпуклые колонии. Растет на лизиновом агаре.
- ***Pichia anomala:*** (ранее *Hansenula anomala*). вырастает на питательном WL агаре в течение 4 дней, образуя колонии кремового или голубоватого цвета, отчетливо голубеющие через 8 дней. Колонии круглые, поверхность гладкая, консистенция маслянистая, но в некоторых случаях отчетливо слизистая. Растет на лизиновом агаре.
- ***Dekkera spp. или Brettanomyces spp***.: вырастает на питательном WL агаре за 8 дней, имеет небольшие куполообразные, кремового цвета, гладкие и маслянистые колонии. Выделяет большое количество уксусной кислоты, хорошо различимой по запаху, которая окрашивает среду в желтый цвет. Растет на лизиновом агаре и на дифференциальном WL агаре. Выращивание на последней среде позволяет отличить вид от *Zygosaccharomyces bailii*.

Примечание: для подтверждения необходимо провести микроскопическое исследование: Dekkera имеет мелкие клетки, и некоторые из них имеют характерную яйцевидную форму.

- ***Zygosaccharomyces bailii.*** Растет на питательном WL агаре в течение 4 дней, давая небольшие круглые колонии кремового цвета, гладкие и маслянистые. Растет на лизиновом агаре, но не на дифференциальном WL агаре. Вокруг молодых колоний часто присутствует желтоватый ободок.

Примечание: при выращивании на бутилированном вине образуются коричневые скопления размером 0,5-1 мм. Клетки не имеют яйцевидной формы.

- Уксуснокислые бактерии растут на питательном WL агаре с небольшими или точечными колониями насыщенно-зеленого цвета, которые являются положительными при тесте на каталазу. (Примечание: Эта среда не подходит для их подсчета).
- Молочнокислые бактерии растут на питательном WL агаре в течение 10 дней в виде небольших, точечного размера каталазоотрицательных колоний. (Примечание: Данная среда не подходит для их подсчёта).

6.2 Распознавание колоний молочнокислых бактерий.

Колонии молочнокислых бактерий полупрозрачные, их размер варьируется от точечного до нескольких мм в диаметре. Они

грамположительны и каталазоотрицательны. *Oenococcus oeni* растут короткими цепочками, педиококки образуют тетрады и диплококки; лактобациллы образуют длинные или короткие палочки.

6.3 Идентификация колоний уксуснокислых бактерий.
Колонии уксуснокислых бактерий являются каталазоположительными и грамотрицательными, а также сильными кислотообразователями: это проявляется в виде четкой зоны вокруг их колоний на питательной среде, содержащей карбонат кальция, или в виде измененного цвета, если среда содержит индикатор pH. Их клетки представляют собой кокки или бациллы и обычно немного крупнее чем молочнокислые бактерии.

Метод OIV-MA-AS4-02A Тип метода: IV

Обнаружение консервантов и ингибиторов ферментации
Метод A 35 изменен резолюцией Oeno 6/2006

1. Тест на ферментируемость

1.1 *Цель*

Показать, не указывая их природу, возможное присутствие одного или нескольких веществ, которые действуют как ингибиторы брожения в вине.

1.2 *Сущность метода*

Вино, свободный диоксид серы которого был связан добавлением водного раствора ацетальдегида, доводят до 10% (об. /об.) спирта. Добавляют глюкозу, чтобы концентрация сахара в питательных растворах составляла от 20 до 50 г/л.

После инокуляции дрожжевым штаммом, устойчивым к спирту, ферментация сопровождается взвешиванием количества выделившегося углекислого газа.

Скорость брожения сравнивается со скоростью брожения подлинного натурального вина, аналогичного по составу анализируемому, а также со скоростью брожения контрольного вина, pH которого был отрегулирован до 6 (при таком pH большинство минеральных и органических кислот не активны в процессе брожения). Эти два эталонных вина инокулируются таким же образом, как и испытуемое вино.

1.3 *Аппаратура*

Колба объемом 90 мл, закрытая резиновой пробкой с отверстием, в которое помещают узкую трубку, сужающуюся в верхней части.

1.4 *Реагенты и среда*

1.4.1 Водный раствор ацетальдегида:

Раствор, приготовленный из ацетальдегида, полученного дистилляцией метальдегида или паральдегида, в присутствии серной кислоты и стандартизированный методом с использованием сульфита натрия. Концентрацию раствора доводят до 6,9 г/л.

1 мл этого раствора фиксирует 10 мг диоксида серы.

1.4.2 Питательные растворы:

– Сульфат аммония, $(NH_4)_2 SO_4$ ……25 г/л
- Аспарагин …..……20 г/л

Эти растворы должны храниться в холодильнике.

1.4.3 Питательная среда:

– Твердая среда: солодовый агар
порошкообразный
солод……3 г
Глюкоза…… 10 г
Панкреатический гидролизат ……... ..5 г
Порошкообразный дрожжевой экстракт ……..3 г
Агар……..20 г
Вода……1 л
pH .....…… 6

Стерилизуют в течение 20 мин. при 118 °C.

Эта смесь существует в коммерческой готовой форме.

- Жидкая среда (как вариант):

- Разводят виноградный сок, содержащий от 170 до 200 г/л сахара, в пробирках, закупоренных ватой, из расчета 10 мл на пробирку; стерилизуют на водяной бане при 100 °C в течение 15 мин.
- Жидкий солод: среда, аналогичная твердой, но без агара.

1.4.4 Культура и поддержание штамма *Saccharomyces bayanus* и приготовление дрожжей.

а) Культура и поддержание штамма на твердой среде: Отобранные штаммы инокулируют линиями (полосками) в пробирки с твердой средой. Эти пробирки помещают в инкубатор при 25°C, пока культура не станет очень заметной (около 3 дней); пробирки можно хранить в холодильнике до 6 месяцев.

б) Подготовка дрожжей:

В одну из пробирок с жидкой средой высеивают штамм, выращенный на твердой среде, в соответствии с принятой микробиологической техникой; после роста (24-48 ч) 2 раза подряд повторяют высевание в ту же среду, обогащенную 10% спиртом (об. /об.), для акклиматизации штамма.

Вторая культура при активном брожении будет содержать около 50 миллионов дрожжей на миллилитр. Эта культура будет служить для инокуляции исследуемого вина. Проводят подсчет и инокулируют из расчета 105 дрожжей/мл.

1.5 *Проведение исследования*

- Подготовка вина:

100 мл вина обрабатывают необходимым количеством ацетальдегида, рассчитанным в соответствии с количеством свободного диоксида серы (44 мг альдегида связывает 64 мг диоксида серы). Оставляют на 24 часа и проверяют, содержит ли вино менее 20 мг свободного диоксида серы на литр.

Если крепость алкоголя превышает 10% (об. /об.), вино следует разбавить одним из растворов глюкозы и воды в количестве, рассчитанном так, чтобы получить концентрацию сахара от 20 до 50 г/л и снизить крепость примерно до 10% (об. /об.). Для вин, содержащих менее 10% об., добавляют твердую глюкозу, чтобы довести без разбавления количество сахара между этими значениями, чтобы скорость брожения не изменялась от количества сахара.

- Анализ на ферментируемость:

В колбу емкостью 90 мл помещают 60 мл вина, приготовленного как указано выше, 2,4 мл раствора сульфата аммония и 2,4 мл раствора аспарагина. Инокулируют 3 каплями 3-дневной культуры *Saccharomyces bayanus*, чтобы получить начальную популяцию, близкую к 105 дрожжей/мл. Устанавливают пробку с заостренной трубкой, взвешивают пробирку с точностью до 10 мг и помещают в печь при 25°C.

Взвешивают ежедневно в течение как минимум 8 дней.

Каждый раз одновременно проводят анализ вина сопоставимого состава и происхождения, не содержащего консервантов, вместе с испытуемым вином, скорректированным по уровню pH равному 6.

Колба с неинокулированным вином показывает потери при испарении.

1.6 *Интерпретация*

В большинстве случаев ферментация начинается в течение 48 часов, а ежедневное выделение газа является наибольшим в период с 3 по 5 день.

Наличие ингибитора ферментации можно подтвердить только при следующих условиях:

а) Если ферментация не начинается или задерживается по крайней мере на 2 дня по сравнению с одним из двух контрольных образцов. При небольшой задержке трудно установить наличие ингибитора, так как могут быть «ложноположительные» результаты, поскольку

некоторые натуральные сладкие вина иногда ведут себя характерно для наличия следов ингибиторов (в частности, сладкие вина, изготовленные из винограда, пораженного благородной гнилью).

б) Если максимальное суточное выделение произошло не между 3 и 5 днем, а после 7 дня, то это выделение должно быть больше или равно 50 мг на 60 мл вина.

в) Построение кривой ферментации и кривой суточного выделения CO_2 в зависимости от времени может облегчить интерпретацию в трудном случае.

Метод OIV-MA-AS4-02B Тип метода: IV

Обнаружение консервантов и ингибиторов ферментации

Метод А 35 изменен резолюцией Oeno 6/2006

1. Обнаружение следующих кислот: сорбиновой, бензойной, пара-хлорбензойной, салициловой, пара-гидроксибензойная и ее эфиры

1.1 *Тонкослойная хроматография*

1.1.1 Сущность метода

Консерванты извлекаются эфиром из предварительно подкисленного вина. После разделения методом тонкослойной хроматографии с полиамидным порошком их обнаруживают и анализируют, исследуя хроматограмму под ультрафиолетовым светом.

1.1.2 Приборы

- Хроматографическая колонка.
- Стеклянные тарелки 20 x 20 см.

Подготовка пластин - тщательно перемешивают 12 г сухого порошка полиамида с 0,3 г флуоресцентного индикатора; добавляют, помешивая, 60 мл метанола; наносят на пластины толщиной до 0,3 мм. Высушивают при комнатной температуре.

Примечание: возможно использование находящиеся в продаже готовых пластин.

1.1.3 Реагенты

- Диэтиловый эфир
- Метанол
- Этанол, 96% (*об. /об.*).
- Серная кислота, разбавленная до 20% (*об. /об.)*
- Безводный сульфат натрия
- Полиамидный порошок для хроматографии (например, Macherey-Nagel или Merck).
- Флуоресцентный индикатор (F254 Merck или аналог).
- Растворитель:

  н-пентан.....10 об.

  н-гексан .....10 об.

Ледяная уксусная кислота .....3 об.

- Стандартные растворы:
  - Готовятся стандартные растворы, содержащие 0,1 г/100 мл 96% этанола (об./об.) следующих кислот: сорбиновой, пара-хлорбензойной, салициловой, пара-гидроксибензойной и их эфиров.

  - Готовится раствор 0,2 г бензойной кислоты на 100 мл 96% этанола (об. /об.).

1.1.4 Сущность метода

Помещают 50 мл вина в разделительную воронку, подкисляют разбавленной 20% серной кислотой (1.1.3.4) и экстрагируют 3 раза, используя 20 мл диэтилового эфира (1.1.3.1) для каждой экстракции. Объединяют промытые растворы в разделительной воронке и промывают несколькими миллилитрами дистиллированной воды. Высушивают эфир с помощью безводного сульфата натрия (1.1.3.2). Выпаривают эфир досуха, используя водяную баню с температурой 100°C или роторный испаритель. Если выпаривание проводится на водяной бане, рекомендуется ускорить выпаривание с помощью слабого потока воздуха, пока не останется 2-3 миллилитра, затем завершают выпаривание на холоде.

Растворяют остаток в 1 мл этанола, наносят 3-5 мкл этого раствора на полиамидную пластинку, а также 3-5 мкл спиртовых растворов различных консервантов (1.1.3.9). Помещают пластину в хроматографический резервуар и насыщают парами растворителя. Дают растворителю мигрировать на высоту около 15 см, что занимает от 1,5 до 2,5 часов.

Вынимают пластину из резервуара и дают высохнуть при нормальной температуре. Исследуют в ультрафиолетовом свете, при длине волны 254 нм. Консерванты появляются в пластине снизу вверх в следующем порядке: пара-гидроксибензойная кислота, эфиры пара-гидроксибензойной кислоты, салициловая кислота, пара-хлорбензойная кислота, бензойная кислота, сорбиновая кислота.

За исключением салициловой кислоты, которая имеет светло-голубую флуоресценцию, другие консерванты дают темные пятна на флуоресцентном желто-зеленом фоне.

Чувствительность. Данный метод позволяет определить следующие минимальные количества различных консервантов, выраженные в миллиграммах на литр:

Салициловая кислота 3
сорбиновая кислота.....5
сложные эфиры пара-гидроксибензойной кислоты 5
пара-гидроксибензойная кислота.....5-10
пара-хлорбензойная кислота.....5-10
бензойная кислота.....20

1.2 *Высокоэффективная жидкостная хроматография*

1.2.1 Описание процедуры

Метод выполняется непосредственно на винах, без пробоподготовки. Необходимо разбавлять красные вина перед введением, чтобы защитить колонку.

При использовании этого метода порог обнаружения консервантов в анализируемом растворе составляет около 1 мг/л.

1.2.2 Технические условия
Подходящими условиями являются следующие:
A. Для определения сорбиновой и бензойной кислоты
В соответствии с методом определения сорбиновой, бензойной и салициловой кислот в винах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (AS313-20-SOBESA), приведенный в Сборнике

B. Для определения пара-хлорбензойной кислоты, пара-гидроксибензойной кислоты и ее эфиров
Колонка: см. A
Подвижная фаза:
Раствор ацетата аммония, 0,01 M + метанол (60 : 40)
pH: 4,5 - 4,6
Скорость потока: см. A
Вводимый объем: см. A
Детектор: УФ, 254 нм
Температура: см. A

БИБЛИОГРАФИЯ

JUNGE Ch., *Zeits. Unters. Lebensmit.,* 1967, **133,** 319

Метод OIV-MA-AS4-02C Тип метода: IV

Обнаружение консервантов и ингибиторов ферментации

Метод A 35, измененный Резолюцией Oeno 6/2006

1 Обнаружение моногалогенпроизводных уксусной кислоты

1.1 *Сущность метода*

Моногалогеновые производные уксусной кислоты экстрагируются эфиром из подкисленного вина. Затем эфир экстрагируют 0,5 М раствором гидроксида натрия. Щелочность экстракционного раствора должна поддерживаться в пределах от 0,4-0,6 М. После добавления тиосалициловой кислоты синтез тиоиндиго осуществляется следующими этапами:

a) Конденсация производного моногалогенов с тиосалициловой кислотой с образованием фенилтиогликоль-о-карбоновой кислоты;

b) Циклизация образовавшейся кислоты в нагретой щелочной среде с образованием тиоиндоксила;

c) Окисление тиоиндоксила феррицианидом калия в щелочной среде с образованием тиоиндиго, растворимого в хлороформе, в котором он дает красный цвет.

1.2 Аппаратура

- Водяная баня при 100°C.
- Механическая мешалка.
- Печь с температурой 200 ± 2°C.

1.3 *Реактивы*

- Диэтиловый эфир.
- Раствор соляной кислоты, разбавленный до 1/3 (об./об.). Смешивают одну часть чистой соляной кислоты, U20 = 1,19 г/мл, с 2 частями дистиллированной воды.
- Безводный сульфат натрия.
- Раствор тиосалициловой кислоты: тиосалициловая кислота 3 г /100 мл раствора гидроксида натрия, 1,5 М.
- Раствор гидроксида натрия, 0,5 М
- Раствор ферроцианида калия, содержащий 2 г $K_3Fe(CN)_6$ на 100 мл воды.
- Хлороформ.

1.4 *Проведение исследования*

В экстракционную колбу с пробкой из шлифованного стекла помещают 100 мл анализируемого вина; добавляют 2 мл соляной кислоты (1.3.2) и 100 мл диэтилового эфира (1.3.1). Энергично встряхивают содержимое в течение нескольких секунд вручную, затем в течение 1 ч с помощью механической мешалки (1.2.2). Переносят в разделительную воронку, дают отделиться и восстанавливают эфирный слой.

Затем несколько секунд интенсивно перемешивают эфирный экстракт с 8-10 г безводного сульфата натрия (1.3.3).

Переносят экстракт в разделительную воронку, добавляют 10 мл раствора гидроксида натрия, 0,5 М (1.3.5); встряхивают в течение 1 мин. Дают остыть.

Извлекают 0,5 мл щелочного экстракта и проверяют титрованием серной кислотой, 0,05 М, чтобы концентрация была в пределах от 0,4 до 0,6 М. Переносят щелочной экстракт, содержащийся в разделительной воронке, в пробирку, содержащую 1 мл раствора тиосалициловой кислоты. При необходимости корректируют силу щелочного экстракта, чтобы довести ее до указанных пределов, используя более сильный раствор гидроксида натрия установленной концентрации. Встряхивают содержимое пробирки в течение 30 секунд и переносят в выпарительную посуду.

Помешают чашку на водяную баню при температуре 100°C, обдувая ее поверхность потоком холодного воздуха. Выдерживают чашку на водяной бане при 100°C ровно 1 час; остаток может стать полностью высушенным за более короткий промежуток времени. Если во время выпаривания на поверхности осадка образуется корка, рекомендуется разбить или растереть ее тонкой стеклянной палочкой, чтобы облегчить выпаривание.

Помещают чашку в духовку, поддерживаемую при температуре 200 ± 2°C, ровно на 30 минут. После охлаждения доливают в чашку 4 мл воды; переносят в делительную воронку, добавляют в чашку 3 мл раствора ферроцианида калия для полного растворения любого оставшегося остатка и приливают в разделительную воронку. Встряхивают в течение 30 секунд для ускорения окисления. Добавляют 5 мл хлороформа, перемешивают 3-4 раза. Дают отстояться.

Розовый или красный цвет (в зависимости от количества образовавшегося тиоиндиго) указывает на присутствие моногалогенных производных уксусной кислоты.

Чувствительность. Метод позволяет обнаружить от 1,5 до 2 мг монохлоруксусной кислоты на литр вина и соответствующие количества

других производных моногалогенов. Поскольку содержание различных экстрактов не является количественным, данный метод не может быть использован для определения количества этих производных моногалогенов в винах.

БИБЛИОГРАФИЯ

FRIEDLANDER, *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.,* 1906, **39,** 1062.
RAMSEY L.L., PATTERSON W.I., *J. Ass. Off. Agr. Chem.,* 1951, **34,** 827. PERONNET M., ROCQUES S., *Ann. Fals. Fraudes,* 1953, 21-23.
Traité de chimie organique, edited by V. Grignard, 1942, **19,** 565-566.
Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 11th édition, publiée par l'Association of Official Analytical Chemists, Washington, 1970, 340-341.
TERCERO C., *F.V., O.I.V.,* 1967, № 224.

Метод OIV-MA-AS4-02D Тип метода: IV

Обнаружение консервантов и ингибиторов ферментации
Метод A 35, модифицированный Резолюцией Oeno 6/2006

1. Исследование и определение этилпирокарбоната (диэтилдикарбоната)

1.1 *Сущность метода*

Диэтилкарбонат, образующийся при разложении этилпирокарбоната (диэтилового эфира пирокарбоновой кислоты) в присутствии этанола, извлекается из вина с помощью дисульфида углерода, а его количество определяется с помощью газовой хроматографии. Может быть использована любая из описанных ниже процедур.

1.2 Аппаратура

1.2.1 Газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором.

1.2.2 Колонки:

- Капиллярная колонка с покрытием Carbowax 1540.
  Длина колонки: 15,24 м
  Внутренний диаметр: 0,51 мм
- Полипропиленгликоль на Celite 545 (15:100), 60-100 меш
  Длина колонки: 2 м
  Внутренний диаметр: 3 мм

1.3 Реагенты

1.3.1 Безводный сульфат натрия

1.3.2 Дисульфид углерода

Дисульфид углерода не должен содержать примесей в критической зоне удержания (от 5 до 7 мин.) для максимальной чувствительности в соответствии с условиями газовой хроматографии, как указано в пункте 1.4.2.

1.4 Проведение исследования

1.4.1 Использование капиллярной колонки.

Помещают 100 мл вина в 250 мл разделительную воронку с 1 мл дисульфида углерода (1.3.2). Энергично перемешивают в течение 1 мин. Отделившуюся фазу дисульфида углерода быстро

центрифугируют, затем высушивают безводным сульфатом натрия (1.3.1).
Вводят 10 мкл прозрачного жидкого супернатанта в хроматограф.
Условия хроматографии:
- Детекторные газы
  водород: 37 мл/мин.
  воздух: 250 мл/мин.
- Поток газа:
  азот: 40 мл/мин.
  Разделитель 1/10 подает на детектор газовую смесь со скоростью потока
  от 3 до 5 мл/мин.
- Температура:
  инжектор: 150 °C;
  печь: 80 °C;
  детектор: 150 °C.
- Пределы обнаружения:
  0,05 мг/л вина

1.4.2 Использование колонки для определения полипропиленгликоля.
Добавляют 20 мл вина и 1 мл дисульфида углерода (1.3.2) в коническую центрифужную пробирку с пробкой. Энергично перемешивают в течение 5 минут, затем центрифугируют в течение 5 минут при центробежной силе от 1000 до 1200 g. Образовавшийся жидкий супернатант отсасывают пипеткой с тонким наконечником; фазу дисульфида углерода высушивают небольшим количеством безводного сульфата натрия, добавленного при перемешивании стеклянной палочкой. Вводят 1 мкл прозрачной жидкости в газовый хроматограф.

Условия хроматографии.
- Детекторный газ:
  водород: 35 мл/мин.
  воздух: 275 мл/мин.
- Поток газа-носителя:
  азот: 25 мл/мин.
- Температура:
  инжектор: 240 °C
  печь: 100 °C
  детектор: 240 °C

- Диапазон чувствительности:
  12 x 10^{-11} A - 3 x 10-^{11} A
- Скорость протяжки ленты:
  1 см/мин.
- Предел обнаружения:
  0,10 - 0,05 мг/л вина.

При таких точных условиях время удержания диэтилкарбоната составляет около 6 мин.

Калибровка прибора проводится с использованием растворов 0,01 и 0,05% (мас./об.) диэтилкарбоната в дисульфиде углерода (1.3.2).

1.5 *Расчет*

Количественное определение диэтилкарбоната проводят преимущественно с использованием метода внутреннего стандарта, ссылаясь на пики изобутилового спирта или изоамилового спирта, которые близки к пикам диэтилкарбоната.

Готовят два образца тестируемого вина: один образец вина с добавлением 10 мл 10% этанола (об./об.), второй – образец того же вина с добавлением 1 мг диэтилкарбоната на литр, с использованием 10 мл раствора диэтилкарбоната 100 мг/л в 10%-ном этаноле (об./об.).

Данные образцы обрабатывают в соответствии с одним из описанных выше методов в зависимости от используемой колонки.

где:

S = площадь пика диэтилкарбоната в пробах вина

S_x = площадь пика диэтилкарбоната в вине,

i = площадь пика внутреннего стандарта в вине,

I = площадь пика внутреннего стандарта в пробах вина.

Концентрация диэтилкарбоната в мг/л вина составляет:

$$\frac{S_x}{S \times \frac{i}{I} - S_x}$$

В случае, когда стандартизация проводится с использованием чистого стандартного раствора диэтилкарбоната, необходимо предварительно определить выход экстракции дисульфидом углерода в соответствии с используемой процедурой. Этот выход выражается коэффициентом экстракции F, десятичное число которого меньше или равно 1 (выход 100%).

Пусть:

S_x = площадь пика диэтилкарбоната, полученного в вине,

S_e = площадь пика, полученная при введении того же объема стандартного раствора диэтилкарбоната концентрации C в мг/л,

V_x = объем вина, использованного для экстракции дисульфидом углерода, V_s = объем дисульфида углерода, использованного для экстракции,

E_e = чувствительность для регистрации S_x,

Концентрация диэтилкарбоната в мг/л вина составляет:

$$\frac{C \times S_\chi \times E_F \times V_S}{S_e \times E_e \times F \times V_\chi}$$

Если концентрация двух растворов, вводимых в хроматограф, одинакова, то реакция будет одинаковой для регистрации S_χ и S_e; формула упрощается и приобретает вид:

$$\frac{C \times S_\chi \times V_S}{S_e \times F \times V_\chi}$$

БИБЛИОГРАФИЯ

KIELHOFER E., WURDIG G., *Dtsch. Lebensmit. Rdsch.,* 1963, **59,** 197-200 & 224-228.
PRILLINGER F., *Weinberg u. Keller,* 1967, **14,** 5-15.
REINHARD C., *Dtsch. Lebensmit. Rdsch.,* 1967, **5,** 151-153.
BANDION F., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein,* 1969, **19,** 37-39.

Метод OIV-MA-AS4-02E Тип метода: IV

Обнаружение консервантов и ингибиторов ферментации

Метод А 35 изменен резолюцией Oeno 6/2006

1. Исследование дегидроуксусной кислоты

1.1 *Сущность метода*

Вино, подкисленное серной кислотой, экстрагируют смесью равных частей диэтилового эфира и петролейного эфира. После выпаривания растворителя экстракт, восстановленный небольшим количеством 96% этанола (об. /об.), осаждают на тонкий слой полиамида и силикагеля с флуоресцентным индикатором и подвергают действию подвижного растворителя (бензол-ацетон-уксусная кислота). Дегидроуксусная кислота идентифицируется и характеризуется ультрафиолетовым исследованием хроматограммы.

1.2 *Аппаратура*

1.2.1 Оборудование для тонкослойной хроматографии
1.2.2.Печь
1.2.3 Ротационный испаритель
1.2.4 Ультрафиолетовая лампа 254 нм

1.3 *Реагенты*

1.3.1 Диэтиловый эфир
1.3.2 Нефтяной эфир (температура кипения ≤ 40 °C)
1.3.3 Метанол
1.3.4 Серная кислота, 20% (об. /об.)
1.3.5 Безводный сульфат натрия.
1.3.6 Этанол, 96% (*об./об.*) .
1.3.7 Хроматографический разделительный слой: 10 г порошка полиамида с флуоресцентным индикатором (например, полиамид DC II UV_{254} от Macherey-Nagel) энергично перемешивают с 60 мл метанола. Добавляют при перемешивании 10 мл воды и 10 мл силикагеля (с флуоресцентным индикатором), например, Kiesselgel GF_{254}Merck. Наносят данную смесь на 5 пластин (200 x 200 мм) до толщины 0,25 мм. Высушивают пластины при комнатной температуре в течение 30 минут, затем помещают в печь при 70°C на 10 мин.

1.3.8 Миграционный растворитель:

Кристаллизующийся бензол..... 60 об.
Ацетон ..... 3 об.
Кристаллизующаяся уксусная кислота ……1 об

1.3.9 Эталонные растворы:

Дегидроуксусная кислота и бензойная кислота, 0,2%, в спиртовом растворе.

Сорбиновая кислота, пара-хлорбензойная кислота, салициловая кислота, пара-гидроксибензойная кислота и ее пропиловые, метиловые и этиловые эфиры, 0,1 % (*мас./об.),* в спиртовом растворе.

1.4 *Проведение исследования*

Подкисляют 100 мл вина, используя 10 мл 20% серной кислоты (1.3.3), затем 3 раза проводят экстракцию, используя 50 мл смеси (50:50) диэтилового эфира и петролейного эфира для каждой экстракции. Удаляют прозрачную водную фазу, оставив водную эмульсию и эфирную фазу. Повторно перемешивают оставшуюся жидкость, состоящую из эмульсии и эфирной фазы в разделительной колбе. Оставшаяся водная фаза обычно четко отделяется от эфирной фазы. Если имеется остаток эмульсии, его следует удалить добавлением нескольких капель этанола.

Полученные фазы диэтилового и петролейного эфира промывают 50 мл воды, высушивают сульфатом натрия, затем выпаривают на роторном испарителе при температуре 30 - 35 °C. Остаток восстанавливают 1 мл этанола.

Наносят 20 мкл данного раствора на стартовую линию в виде полосы шириной 2 см или 10 мкл в виде круглого пятна. Для стандарта сравнения вносят по 5 мкл каждого из описанных выше эталонных растворов. После хроматографии (высота подъема миграции 15 см, продолжительность от 1 часа 15 мин. до 1 часа 45 мин., при нормальном насыщении камеры) пластину высушивают при комнатной температуре. Присутствующая дегидроуксусная кислота и другие консерванты проявляются под УФ-лампой при 254 нм.

Если исследование хроматограммы показало присутствие пара-хлорбензойной кислоты, пропилового или метилового эфиров пара-гидроксибензойной кислоты, частично отделенных этим методом, то идентификацию можно провести на вышеописанном экстракте, следуя методу из раздела 2.1. Тонкослойная хроматография «Исследование сорбиновой, бензойной, пара-хлорбензойной кислот».

БИБЛИОГРАФИЯ

HALLER H.E., JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.,* 1972, n° 397, *Mitt. Bl. der Gd CH, Fachgru*

Метод OIV-MA-AS4-02F Тип метода IV

Обнаружение консервантов и ингибиторов брожения

Метод A 35, измененный резолюцией Oeno 6/2006

1. Азид натрия

1.1 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

1.1.1 Сущность метода

Гидразойную кислоту, выделенную в вине двойной дистилляцией, идентифицируют после дериватизации 3,5-динитробензоилхлоридом, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Обнаружение проводят методом ультрафиолетовой абсорбционной спектрофотометрии при 240 нм.

1.1.2 Аппаратура

1.1.2.1 Дистилляционная установка (дистилляционная установка для определения доли спирта); на конце конденсатора – сужающаяся трубка.

1.1.2.2 Сферические колбы объемом 500 мл с притертым стеклянным горлом.

1.1.2.3 Колба объемом 10 мл с притертой стеклянной пробкой.

1.1.2.4 Аппарат для ВЭЖХ

- Рабочие параметры:
  Колонка: C_{18}, длина 25 см.
  Подвижная фаза: ацетонитрил - вода (50:50).
  Скорость потока: 1 мл/минута.
  Объем вводимого вещества: 20 мкл.
  Детектор: ультрафиолетовый абсорбционный спектрофотометр при 240 нм.
  Температура: окружающая среда.

1.1.3 Реагенты

1.1.3 1 Гидроксид натрия, 5% (*масса/об.*).

1.1.3.2 Раствор серной кислоты, 10% (*масса/об.)*

1.1.3.3 Индикаторный реагент: 100 мг метилового красного и 50 мг метилового синего, 100 мл спирта, 50% (*об./об.*).

1.1.3.4 Ацетонитрил для хроматографии.

1.1.3.5 Дериватизирующий реагент: 3,5-динитробензоилхлорид, 10% (*масса/об.*), в ацетонитриле.
1.1.3.6 Буферный раствор ацетата натрия, pH 4,7: смешивают 1 объем раствора ацетата натрия, $NaC_2H_3O_2.3H_2O$, 1 М, с 1 объемом раствора уксусной кислоты, 1 М.
1.1.3.7 Азид натрия, NaN_3.

1.1.4 Проведение исследования
1.1.4.1 Подготовка пробы
В сферическую колбу с притертым стеклянным горлом помещают 100 мл вина, дистиллируют, погрузив конец конденсатора в 10 мл 5% раствора гидроксида натрия (1.1.3), к которому добавляют несколько капель индикаторного реагента. Дистиллируют до тех пор, пока не наберется 40 -50 мл дистиллята.

Переносят дистиллят в другую сферическую колбу (1.1.2.2), дважды ополаскивают колбу с помощью 20 мл воды и добавляют воду, чтобы довести объем до 100 мл. Для удаления этанола присоединяют колбу к дистилляционной установке и удаляют около 50 мл дистиллята (объем уменьшают вдвое).
Полностью охлаждают колбу. Подкисляют 10% серной кислотой. Дистиллируют, отбирают дистиллят в колбу объемом 10 мл с притертой стеклянной пробкой, содержащую 1 мл воды, и погружают в ледяную баню. Дистилляцию останавливают, когда общий объем достигает 10 мл.
1.1.4.2 Дериватизация
Смешивают 1 мл дистиллята (1.1.4.1), 0,5 мл ацетонитрила, 0,2 мл буферного раствора и 30 мкл дериватизирующего реагента и энергично размешивают; оставляют на пять минут.
1.1.4.3 Хроматография
Вводят 20 мкл в соответствии с указанными условиями, время удержания производного гидразойной кислоты составляет около 11 минут. Предел обнаружения: 0,01 мг/л.
Примечание: Иногда другое, не дериватизированное вещество может имитировать гидразойную кислоту. Положительный результат проверяют следующим образом: вводят напрямую 20 мкл дистиллята; исчезновение пика указывает на присутствие гидразойной кислоты.

1.1.5 Расчет
Для определения концентрации азида натрия сравнивают реакцию пробы с реакцией стандартного раствора после дериватизации.

Учитывают коэффициент концентрации 10 в пробе вина на момент анализа.

1.2 Колориметрический метод

1.2.1 Сущность метода

Гидразойную кислоту, которая является очень летучей, отделяют методом двойной дистилляции, что позволяет удалить этанол, уксусную кислоту и диоксид серы. Затем определяют колориметрически количество после образования окрашенного комплекса с хлоридом железа (максимум поглощения при 465 нм).

1.2.2 Аппаратура

1.2.2.1 Простая дистилляционная установка, состоящая из колбы объемом 500 мл с притертым стеклянным горлом и конденсатора, заканчивающегося сужающейся трубкой.

1.2.2.2 Спектрофотометр с ячейками из оптического стекла с длиной пути 1 см.

1.2.3 Реагенты

1.2.3.1 Раствор гидроксида натрия, 1 М.

1.2.3.2 Серная кислота, 1 М.

1.2.3.3 Перекись водорода, 3% (*об./об.*), концентрация которой должна быть откорректирована непосредственно перед использованием с помощью раствора перманганата калия, 0,02 М; где *p* мл равно объему, который окисляет 1 мл раствора перекиси водорода, 3%.

1.2.3.4 Раствор хлорида железа при 20 г на литр Fe III: (взвешивают 96,6 г $FeCl_3.6H_2O$, или больше, т.к. эта соль очень гигроскопична; проверяют концентрацию Fe III в растворе и при необходимости доводят до 20 ± 0,5 г на литр).

1.2.3.5 Стоковый раствор азида натрия, NaN_3, 1 г на литр в дистиллированной воде.

1.2.3.6 Раствор азида натрия 200 мг на литр, приготовленный путем разбавления раствора 1 г на литр.

1.2.4. Проведение исследования

a) В колбу объемом 500 мл с притертым стеклянным горлом помещают 200 мл вина, дистиллируют, отбирают дистиллят в мерную колбу объемом 50 мл, содержащую 5 мл воды, которая погружена в ледяную баню. Дистилляцию останавливают, когда общий объем достигает примерно 50 мл.

b) Количественно переносят дистиллят в другую колбу объемом 500 мл с пробкой и дважды ополаскивают колбу объемом 50 мл с помощью 20 мл воды.
Нейтрализуют 1M раствором гидроксида натрия (1.2.3.1) (с применением индикаторной бумаги для определения pH).
Подкисляют с помощью 10 мл 1M серной кислоты (1.2.3.2), смешивают, затем окисляют диоксид серы, добавляя 3% раствор перекиси водорода (1.2.3.3.).
Если вино содержит S мг на литр диоксида серы, и если *p* мл - это объем 0,02M раствора перманганата калия, необходимый для окисления 1 мл 3% раствора пероксида водорода, то для 200 мл вина применяют следующий расчет:

$$\frac{S}{5 \times 3.2p} = \frac{S}{16p}$$ мл раствора H_2O_2

Доводят объем примерно до 200 мл, добавляя дистиллированную воду.
Дистиллируют, отбирают дистиллят в стеклянную колбу объемом 50 мл, содержащую 5 мл дистиллированной воды и погруженную в ледяную баню; останавливают дистилляцию до измерительной линии, доводят до температуры окружающей среды и доводят объем до 50 мл.
c) Добавляют 0,5 мл (измеряется точно) раствора хлорида железа, смешивают и немедленно (максимальная задержка 5 минут) замеряют

поглощение при 465 нм в кювете 1 см; на приборе выставляют ноль с помощью холостого раствора, состоящего из 50 мл воды, добавленной к 0,5 мл раствора хлорида железа.

d) Построение стандартной кривой

В каждую из пяти мерных колб объемом 50 мл добавляют 1, 2, 3, 4 и 5 мл раствора азида натрия, из расчета 200 мг/л соответственно, доводят объем дистиллированной водой до 50 мл, добавляют 0,5 мл раствора хлорида железа и замеряют поглощение при 465 нм.

Данные растворы содержат 4, 8, 12, 16, 20 мг азида натрия на литр. Соответствующие концентрации составляют 1, 2, 3, 4 и 5 мг на литр вина.

Типичная кривая изменения поглощения в зависимости от концентрации представляет собой прямую, проходящую через начало координат.

1.2.5 Расчет

Показания абсорбции для анализируемой пробы наносят на прямую и интерполируют концентрацию азида натрия в мг/л вина.

БИБЛИОГРАФИЯ

Метод ВЭЖХ:

SEARIN S.J. & WALDO R.A., *J. Liquid. Chrom.,* 1982, **5**(4), 597-604.
BATTAGLIA R. & MITISKA J., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.,* 1986, **182,** 501-502.

Колориметрический метод:
CLERMONT S. & CHRETIEN D., *F.V., O.I.V.,* 1977, n° 627.

Метод OIV-MA-AS4-03 Тип метода IV

Определение количества дрожжей *Brettanomyces bruxellensis* методом кПЦР

(Oeno 414-2011)

Предупреждение для лиц, проводящих манипуляции
Фенол: Все манипуляции с фенолом должны проводиться в вытяжном шкафу с использованием перчаток. Все загрязненные фенолом остатки должны быть собраны в подходящие емкости.
Краситель SYBR Green: Демонстрирует ненулевую мутагенность, но меньшую, чем бромистый этидий. Тем не менее, при использовании необходимо соблюдать меры предосторожности.

1. Область применения

В данном протоколе описан способ определения количества дрожжей *Brettanomyces bruxellensis* в разливном вине или бутылочных винах методом кПЦР в реальном времени (количественная полимеразная цепная реакция) (кПЦР). Анализ вин при СБ (спиртовое брожение) и сусел еще не утвержден.

2. Определение

Микроорганизмы, подсчитываемые данным методом: дрожжи *Brettanomyces bruxellensis*, имеющие копию целевого гена.

3. Сущность метода

При методе ПЦР целевой участок ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), идентифицированный двумя праймерами, амплифицируют путем многократного повторения ферментативной реакции. Процесс включает в себя повторение трехэтапного цикла:

- денатурация ДНК путем нагревания;
- гибридизация праймеров;
- полимеризация, проводимая с помощью *Taq*-полимеразы (*Thermophilus aquaticus*).

Однако, в отличие от традиционной ПЦР, кПЦР может с помощью флуорофора количественно определить ДНК, амплифицированную в процессе амплификации.

До сих пор в качестве мишеней использовались два характерных для данного вида участка. Один участок - кодирующий ген 26S рибосомальной РНК (рибонуклеиновая кислота), другой - ген RAD4 [2, 3]. Как и метод FISH, ПЦР предназначен для *Brettanomyces bruxellensis*, но преимущество последнего в том, что он менее дорогостоящий.

Отличительная особенность кПЦР заключается в возможности считывать после каждого цикла амплификации флуоресценцию, увеличивающуюся по экспоненте по мере амплификации ДНК. Для данного применения было разработано множество методов флуоресценции. Для использования с *Brettanomyces* признан подходящим флуорофор SYBR® Green.

❖ Флуорофор SYBR® Green

Данный агент сильно флуоресцирует, когда неспецифическим образом встраивается между нуклеотидами в двухцепочечной ДНК. В то же время в несвязанном состоянии он флуоресцирует слабо. Используя эту технологию, в конце амплификации можно получить единую кривую, которая подтверждает специфичность реакции.

❖ Внутренний стандарт

Для проверки этапов выделения и амплификации ДНК в метод был включен внутренний стандарт ((Lip4) *Yarrowia lipolytica*).

4. Реагенты и материалы

Все пластиковые расходные материалы следует предварительно автоклавировать для уничтожения ДНКазы (дезоксирибонуклеаза), также как и буферные растворы Tris-HCl и TE (Tris EDTA, этилендиаминтетрауксусная кислота), ацетат аммония и сверхчистую воду (18 MΩ). Все водные растворы готовятся с использованием сверхчистой воды (18 MΩ). Некоторые растворы стерилизуются в автоклаве (обозначаются как "автоклавированный"). Стерильная сверхчистая вода (18 MΩ) используется по возможности для приготовления любых растворов, которые не автоклавируются. В этом случае нет необходимости работать в стерильных условиях.

- **ПВПП** (например: ISP Polyclar Super R или Sigma P6755-100G);
- **растворы при комнатной температуре**: буфер Tris-HCl, 10mM pH8, раствор I (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM, NaCl

100mM, SDS 1% (додецилсульфат натрия), Triton X-100 2%), TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1mM) автоклавированный, 4M ацетат аммония, абсолютный этанол;

- предусматривается **один флакон автоклавированной, стерильной, сверхчистой (18** MΩ**)** воды (20мл) на один планшет для ПЦР;
- **растворы при 4°C**: насыщенный фенол pH8: хлороформ: IAA (изоамиловый спирт 24:25:1) и РНаза (рибонуклеаза) 1 мкг/мкл;
- **суспензия при –20°C**: внутренний стандарт SYBR Green (например: iQ SBYR Green Supermix Bio-Rad 170-8884), праймеры 4 мкм Brett rad3, Brett rad4, YAL-F и YAL-R по одному;
- **баня сухого нагрева, выставленная на 37°C**.

Все манипуляции с фенолом должны проводиться в вытяжном шкафу с использованием перчаток. Все загрязненные фенолом остатки должны быть собраны в подходящие емкости.

Вещества для ПЦР	Характеристики	Номер CAS
4.1 Ацетат аммония	> 98%	631-61-8
4.2 Фенол:хлороформ:IAA (24:25:1)	Ультра	136112-00-0
4.3 Протеиназа *K*	1215 Ед/мг белков (16,6 нг/мл)	39450-01-6
4.4 SDS	> 99% ультра	151-21-3
4.5 База Tris	> 99.8% ультра	77-86-1
4.6 BSA	Молекулярно-биологический класс	9048-46-8
4.7 Насыщенный фенол pH 8		108-95-2
4.8 ПВПП 360kDa		9003-39-8
4.9 РНаза А	70 Ед/мг в растворе	9001-99-4

4.10 TE pH8	Ультра	Tris : 77-86-1 EDTA : 60-00-4
4.11 Праймеры 25нмоль		-

5. Аппаратура

- **Пластиковые расходные материалы**: микропробирки с винтовой крышкой объемом 2 мл, микропробирки объемом 1,5 и 1,7 мл, белые (10 мкл), желтые (200 мкл) и синие (1000 мкл) наконечники для микропипеток P20, P200, P1000, P5000, 96-луночные микропланшеты для ПЦР и оптическая пленка, неопудренные перчатки;
- **стеклянные шарики** (Ø 500 мкм);
- **флакон** (20 мл) с автоклавированной, сверхчистой [18 MΩ] стерилизованной водой на каждый планшет для кПЦР);
- **пробирки для центрифуги** объемом 15 и 50 мл;
- **Оснащение**:
  автоматические пипетки (P20, P200, P1000, P5000);
  центрифуга для микропробирок;
  автоматическая мешалка для разделения клеток (например, GenieDisruptor);
  термоциклер, соединенный со спектрофлуориметром (оптическая система для отслеживания флуоресценции, генерируемой при реакциях ПЦР в реальном времени);
  магнитная мешалка;
  секундомер;
  баня сухого нагрева, выставленная на 37°C;
  автоклав;
  мерные колбы объемом 100 мл,
  мерные колбы объемом 50 мл;
  мерные колбы объемом 10 мл;
  мерный стакан объемом 100 мл;
  мерный стакан объемом 50 мл;
  мерный стакан объемом 10 мл;
  магнитные мешалки.

6. Отбор и подготовка проб

6.1. Расчеты по пробам

Пробы отбирают либо непосредственно в склянки для анализа, либо в предварительно стерилизованные колбы для проб.

Никакой интерференции метода с протестированными дрожжами (включая K1 и L2056), когда популяция дрожжей не превышает 5.10^6 КОЕ/мл (колониеобразующие единицы), не наблюдалось. Данных для популяций, превышающих этот показатель, нет, следовательно, следует избегать измерения вин во время СБ (спиртовое брожение).

ПРИМЕЧАНИЕ: При определении количества дрожжей с использованием стандартных микробиологических методов анализа (рост в агаровой среде, оптическая плотность) результаты выражаются в КОЕ/мл (колониеобразующие единицы). И в то же время результат, полученный при анализе методом кПЦР, выражается в ГЕ/мл (генетическая единица).

6.2. Подготовка внутреннего стандарта

Yarrowia выращивают в жидком YPD (дрожжевая пептонная декстроза) при 28°C до достижения OD_{600} (оптическая плотность при 600 нм) 1 (приблизительно 48 часов).

После оценки $OD_{600нм}$ разбавляют до 1.0×10^6 КОЕ/мл в изотоническом физиологическом растворе (1 OD = 1.0×10^7 КОЕ/мл).

110 мкл пробы культуры $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл переносят в микропробирку объемом 1,7 мл и добавляют 110 мкл 40 % глицерина, чтобы получить популяцию $5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл. Перемешивают и хранят при -80°C. Одна пробирка может быть использована для обработки 5 проб вина.

Расчет для проверки титра суспензии проводят одновременно.

6.3. Подготовка растворов

100 мл Tris-HCl pH8 10 mM: взвешивают 0,121 г базы Tris (например: база Trizma) и растворяют в 80 мл сверхчистой [18 MΩ] воды.

Корректируют pH с помощью HCl. Доводят объем до 100 мл. Автоклавируют.

100 мл ТЕ: взвешивают 0,121 г базы Tris и растворяют в 80 мл воды. Корректируют pH с помощью HCl. Добавляют 37,2 мг EDTA. Доводят pH до 8 (для облегчения растворения EDTA), затем доводят объем до 100 мл. Автоклавируют.

100 мл раствора I: подготавливают 50 мл ТЕ 2x и добавляют 10 мл 1M NaCl, 10 мл SDS 10% (растворено путем плавного нагрева) и 2 г Triton X100, затем доводят до объема.

4M ацетат аммония: 15,4 г ацетата аммония растворяют в 50 мл сверхчистой [18 MΩ] воды qs до 50 мл.

100 мл фенол:хлороформ:IAA (25:24:1): добавляют 48 мл хлороформа и 2 мл изоамилового спирта к 50 мл фенола, насыщенного буфером ТЕ pH8. Хранят при 4°C.

РНаза А 1 мкг/мкл: раствор 70 Ед/мг РНазы А (например, Sigma, R4642-50MG, хранящийся при -20°C) разбавляют сверхчистой [18 MΩ] водой. Указанная концентрация стока РНазы указана на пробирке и в спецификации к партии. Разбавленный раствор хранят при температуре не выше 4°C до 3 недель.

Праймеры 4 мкМ Brett: используя 100 мкМ стоковых растворов праймеров (в пробирках поставщика), смешивают 4 мкМ Brett rad3 (GTTCACACAATCCCCTCGATCAAC) и 4 мкМ Brett rad4 (TGCCAACTGCCGAATGTTCTCTC) qs до 1 мл со сверхчистой [18 MΩ] водой. Хранят до 1 года при температуре -20°C.

Праймеры 4 мкМ YAL: используя 100 мкМ стоковых растворов праймеров (в пробирках поставщика), смешивают 4 мкМ YAL-F (ACGCATCTGATCCCTACCAAGG) и 4 мкМ YAL-R (CATCCTGTCGCTCTTCCAGGTT) qsp до 1 мл со сверхчистой [18 MΩ] водой. Хранят до 1 года при температуре -20°C.

7. Проведение исследования

Анализируемая проба: склянку встряхивают, чтобы гомогенизировать ее содержимое.

Для закупоренной склянки: дезинфицируют горлышко склянки 70% спиртом и откупоривают ее над открытым пламенем с помощью штопора, продезинфицированного 70% спиртом.

15-20 мл пробы вина переносят в 30 мл стерильный пластиковый флакон одноразового использования объемом 30 мл.

Этапы, на которых протокол может быть приостановлен, обозначены знаком * (максимальное время прерывания, T°).

7.1. Отделение клеток

Данный этап должен быть продублирован.

Манипуляции проводят в замкнутом боксе микробиологической безопасности, специально предназначенном для данных целей.

- Берут **1 мл пробы вина** и переносят в микропробирку объемом 2 мл с винтовой крышкой;
- добавляют 20 мкл внутреннего стандарта в концентрации 5.0 x 10^5 КОЕ/мл;
- центрифугируют в течение **30 секунд при 9,300g**;
- удаляют надосадочную жидкость, осторожно перевернув микропробирку;
- суспензируют осадок в **1 мл чTris-HCl 10 mM pH 8**;
- центрифугируют в течение **30 секунд при 9,300g** и удаляют надосадочную жидкость;
- перемешивают на вортексе в течение непродолжительного времени, чтобы суспензировать осадок в остаточной жидкости ***(3 месяца, -20°C)**.

Одна пробирка будет использоваться для извлечения ДНК, а другая - храниться при температуре -20°C до получения валидированных результатов.

7.2. Извлечение ДНК

Из свежего или замороженного осадка. Одновременно обрабатывают не более 24 проб.

- Добавляют **ПВПП** (1% от конечной массы/объема) путем взвешивания, добавляют **0,3 г 200-500 мкм стеклянных шариков**;
- **добавляют 200 мкл раствора I**;
- **добавляют 200 мкл фенола:хлороформа:IAA (24:25:1)**;
- разъединяют клетки с помощью автоматической мешалки (например, **GenieDisruptor**) **4x80 секунд** с холодными интервалами (-20°C холодильная установка) продолжительностью около 80 секунд между каждой фазой разъединения;
- добавляют **200 мкл TE**;
- центрифугируют в течение **5 минут при 15700g**.
- **тщательно** собирают 400 мкл верхней водной фазы в микропробирку объемом 1,7 мл;

При смешивании двух фаз этап центрифугирования повторяют.

- добавляют **1 мл абсолютного этанола** и перемешивают, переворачивая пробирку 4-5 раз * **(несколько часов, комнатная температура)**;
- центрифугируют в течение **5 минут при 15700g** и удаляют надосадочную жидкость, перевернув микропробирку;
- суспензируют осадок в **400 мкл TE и 30 мкл РНКазы в концентрации 1 мкг/мкл**;
- инкубируют раствор при **37°C в течение 5 минут (затем выставляют 48°C**);
- добавляют 10 **мкл 4M ацетата аммония + 1 мл абсолютного этанола**; перемешивают, переворачивая пробирку;
- центрифугируют в течение **5 минут при 15700g**;
- удаляют надосадочную жидкость, перевернув; для впитывания последних капель используют бумажный фильтр;
- высушивают осадок (открытую пробирку оставляют в сухой ванне при 48°C примерно на 1 час);
- к осадку добавляют 25 мкл TE, перемешивают на вортексе и оставляют при 4°C на 1 - 18 часов (для способствования солюбилизации ДНК). Перемешивают с помощью автоматической мешалки ***(несколько недель, -20°C)**.

7.3. кПЦР

Для каждой пробы вина отводят 2 лунки с праймерами Brett rad3/4 и 2 лунки внутреннего стандарта с праймерами YAL. Для каждого планшета обеспечивают отрицательный контроль с TE для каждой пары праймеров, который будет проведен в качестве заключительной

операции. Также проводят положительный контроль на ДНК *Brettanomyces bruxellensis*, имеющейся при -20°C. Для приготовления положительного контроля добавляют 5 мкл стокового раствора (4,5 GU / мл) в конечный реакционный объем 25 мкл.

Программа амплификации ПЦР:

Число циклов	Время (секунды)	Температура (°C)
1	180	95
40	30	95
	10	64.6
Единая кривая выстраивается после 90°C путем уменьшения нагрева на 0,5°C каждые 10 секунд.		

Число лунок Brett = число лунок YAL = 2 x число проб + 2

В приведенной ниже таблице указано число лунок и количество каждого компонента смеси в зависимости от числа проб.

число проб	число лунок	Вода при18 MΩ (мкл)	iQ SYBR Green Supermix (мкл)	смесь 4 мкМ праймеров (мкл)
1	4	26.3	65.6	13.1
2	6	36.8	91.9	18.4
3	8	47.3	118.1	23.6
4	10	57.8	144.4	28.9
5	12	68.3	170.6	34.1
6	14	78.8	196.9	39.4
7	16	89.3	223.1	44.6
8	18	99.8	249.4	49.9
9	20	110.3	275.6	55.1
10	22	120.8	301.9	60.4
11	24	131.3	328.1	65.6
12	26	141.8	354.4	70.9
13	28	152.3	380.6	76.1
14	30	162.8	406.9	81.4

15	32	173.3	433.1	86.6
16	34	183.8	459.4	91.9
17	36	194.3	485.6	97.1
18	38	204.8	511.9	102.4
19	40	215.3	538.1	107.6
20	42	225.8	564.4	112.9
21	44	236.3	590.6	118.1
22	46	246.8	616.9	123.4
23	48	257.3	643.1	128.6

- Из морозильной камеры извлекают праймеры Brett 4 мкМ и YAL 4 мкМ;
- извлекают SYBR Green (4°C, если пробирка используется в данный момент, в противном случае -20°C);
- готовят смесь Brett и смесь YAL в количестве, указанном в таблице выше для соответствующего числа проб;
- на дно каждой лунки вносят 20 мкл смеси;
- 5 мкл гомогенизированного раствора ДНК добавляют в автоматическую мешалку (или 5 мкл воды для отрицательного контроля);
- оптическую пленку регулируют и загружают планшет.

7.4. Считывание результатов

- планшет извлекают и помещают непосредственно в пакет для утилизации (**не открывать**);
- базовую линию устанавливают на 100;
- анализируют (в следующем порядке):
    - отрицательные контрольные пробы, которые не должны давать сигнала. Если наблюдается Ct менее 37, процесс повторяют, меняя все растворы,
    - положительная контрольная проба по Brett: значение Ct должно быть приблизительно 25, с температурой плавления 82,5°C (± 0,5°C);
    - внутренние стандарты YAL: если получен Ct, проверяют температуру плавления продукта (84°C ± 0,5°C). Если продукт не соответствует требованиям, отсутствие сигнала Brett не может быть интерпретировано;

- пробы: проверяют Tm продукта *Brettanomyces bruxellensis* (82°C ± 0,5°C). Если и только если показатель Tm приемлем, проверяют экспоненциальный профиль амплификации. Затем записывают значения Ct и наносят их на стандартную кривую.

ПРИМЕЧАНИЕ: Ct - время, необходимое для того, чтобы флуоресценция целевой последовательности достигла порогового значения. Следовательно, это минимальное количество циклов ПЦР, необходимое для того, чтобы флуоресцентный сигнал выделился из фонового шума.

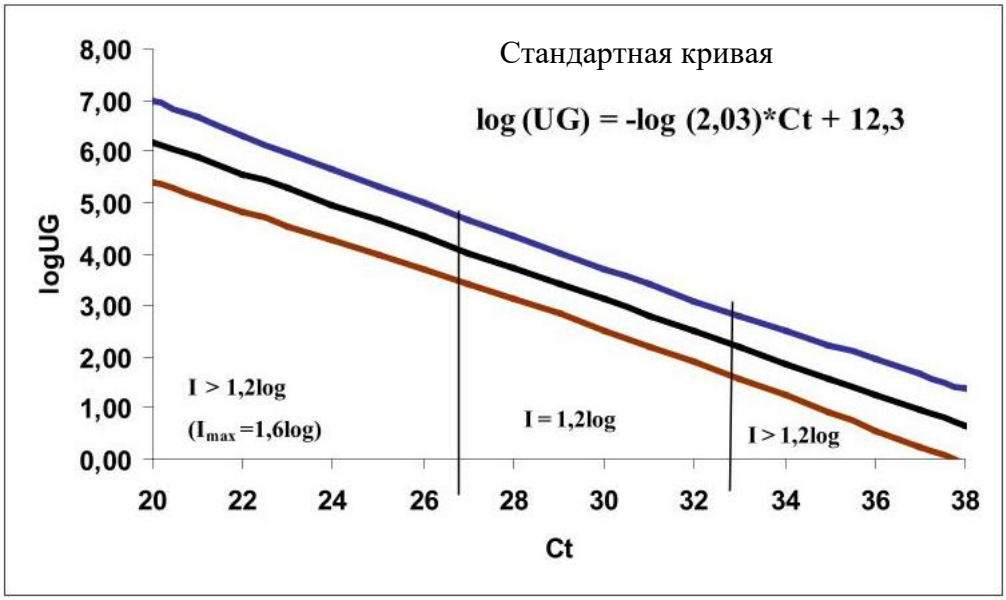
8. Расчеты (результаты)

Пять штаммов *Brettanomyces bruxellensis* были инокулированы в различных концентрациях: от 3,1 x 10^5 до 3 КОЕ/мл на 14 винах (3 белых, 2 розовых, 9 красных, содержание фенольных соединений в которых значительно варьировалось). Затем ДНК была экстрагирована в присутствии 1% ПВПП.

Стандартная кривая построена на основе результатов, полученных при различных комбинациях вин и штаммов.

Результаты получены в ГЕ/мл (генетическая единица/мл) из стандартной кривой

logGU = - log(2.03) x Ct + l2.34



9. Характеристики метода: параметры внутрилабораторной валидации

9.1. Линейность, повторяемость и воспроизводимость [4]

Калибровочный график из 6 точек построен в диапазоне от 0 до $2x10^5$ КОЕ/мл штамма L02I1 в вине с четырьмя репликами. Данный диапазон популяции выбран по обычным уровням *Brettanomyces bruxellensis* в винах. Отношение измеренного log GU к теоретическому log GU описано с помощью простого регрессионного анализа. Параметры регрессии, наклон и пересечение определены в соответствии с представленной ниже таблицей. Модель регрессии принята с риском $\alpha = 1\%$, и выбранная область линейности валидирована, т.к. в модели не обнаружено ошибок.

Точность метода сравнивалась с точностью, полученной при классическом культуральном методе. Три оператора подготовили ДНК, выделенную из вина, инокулированного штаммом L02I1 на двух уровнях: $1.9x10^4$ (высокий) или $1.9x10^2$ (низкий) КОЕ/мл. Для каждого экстракта ДНК было проведено четыре повтора ПЦР. Стандартное отклонение для повторяемости и воспроизводимости, соответственно S_r и S_R, рассчитано из значений log GU для обоих уровней (таблица ниже). Для метода кПЦР S_r и S_R были схожи при низком уровне популяции, а при высоком уровне S_R было больше, чем S_r. Оба стандартных отклонения были в два раза выше, чем при классическом микробиологическом методе. Этот эффект объясняется увеличением числа этапов при использовании метода кПЦР.

Таблица

Параметр	Значения
Регрессивное уравнение	
Область (КОЕ/мл)	от 0 до $2x10^5$
Наклон (±SD)	0.957 (0.044)
Пересечение (±SD)	-0.049 (0.142)
Модель регрессии	F_{obs}>F(1.18): линейная модель принята
Ошибка модели	F_{obs}<F(4.18): ошибки модели нет
Точность	
S_r кПЦР (низкий/высокий)	0.26/0.25
S_r микробио (низкий/высокий)	0.17/0.04
S_R кПЦР (низкий/высокий)	0.29/0.41
S_R микробио (низкий/высокий)	0.17/0.04
Достоверность	
Средние 43 пробы (D)	2.39 (кПЦР)/2.25 (микробио)
S_R D	1.18
Проверка равенства W=D/S_R D	0.11<3 достоверность допустимая

9.2. Предел обнаружения (LoD) и предел количественного определения (LoQ) [4]

Пределы LoD и LoQ указывают на чувствительность метода. Предел LoD - это наименьшая популяция, обнаруженная данным методом; предел LoQ – это минимальная популяция, количество которой можно точно определить. При анализе пищевых продуктов эти параметры

рассчитываются по фону. Однако при кПЦР фон отсутствует. Поэтому мы прибегли к двум другим подходам для оценки пределов LoD и LoQ. При первом методе используют наклон, пересечение и стандартную ошибку на пересечении, которые получены при экспериментах по проверке линейности. С помощью этого метода для пределов LoD и LoQ были получены значения 3 и 31 ГЕ/мл соответственно. При втором подходе предел обнаружения получен на уровне популяции, что привело к одному отрицательному результату из 10 независимых измерений. Анализ данных, полученных от 14 вин, инокулированных пятью штаммами, показал, что 96% проб (48/50), содержащих от 101 до 250 КОЕ/мл, дали положительный сигнал, 83% (49/59) были положительными, если они содержали от 26 до 100 КОЕ/мл, и 65% (44/68), если - от 5 до 25 КОЕ/мл. Таким образом, предел обнаружения, оцененный по данному методу, находится в диапазоне 26 - 100 КОЕ/мл. При систематическом повторении каждого ПЦР-анализа, благодаря расчетам вероятности $(1 - p)^2$, был подтвержден предел обнаружения 5 КОЕ/мл. Следует отметить, что 88% проб были положительными для 5 КОЕ/мл. Показатель увеличился до 97% для 25 КОЕ/мл.

10. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Phister T.G., Mills D.A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7430-7434.

2. Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R., Comi G., 2003.Molecular detection and identification of *Brettanomyces*/*Dekkera bruxellensis Brettanomyces*/*Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1347-1355.

3. Ibeas J.I., Lozano I., Perdigones F., Jimenez J., 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 998-1003.

4. Tessonnière H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H., Remize F., 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 237-243.

Метод OIV-MA-AS5-01 Метод типа IV

Дифференциация крепленых сусел и сладких крепленых вин

1. Сущность метода

1.1 *Метод скрининга*

Согласно определениям продуктов из кодекса МОВВ (Международный кодекс энологических практик), содержание приобретенного спирта, полученного естественным путем в результате брожения, составляет для крепленых вин минимум 4%, тогда как для крепленых сусел допускается максимум 1% приобретенного спирта. Следовательно, эти продукты могут быть дифференцированы путем идентификации побочных продуктов брожения с помощью газовой хроматографии.

Указанный метод применяется только в том случае, если, как следует из определения, спирт, используемый для производства крепленого сусла, является нейтральным.

1.2 *Научное исследование цитрамалевой кислоты методом тонкослойной хроматографии*.

Для сладких крепленых вин характерно присутствие цитрамалевой кислоты. Она распознается методом тонкослойной хроматографии после отделения сахаров с помощью ионообменной колонки.

2. Метод скрининга

2.1 *Аппаратура*

Газовый хроматограф, а также:

- пламенно-иоанизационный детектор;
- колонка из нержавеющей стали - длина 3 м, внутренний диаметр 2 мм;
- неподвижная фаза: Carbowax 20 M 20%;
- носитель: Chromosorb W 60/80 меш.

Условия проведения хроматографии:

- температура:

  инжектор: 210°C

  детектор: 250°C

  печь: изотермическая при 70°C в течение 6 минут; затем программируют 6°C/минута;

верхняя граница температуры: 170°C

Допускается использование других типов колонок.

Ниже описана методика в качестве примера.

2.2 *Проведение исследования*

2.2.1. Подготовка пробы

Способ проведения сепарации: к 25 мл пробы (крепленое сусло или сладкое крепленое вино) добавляют 7 мл этанола и 15 г сульфата аммония, $(NH4)2SO4$, перемешивают.

Дают отстояться для разделения фаз.

2.2.2 *Хроматография*

Вносят 2 мкл органической фазы и проводят хроматографию, как указано выше.

Хроматограмма крепленого вина дифференцируется по наличию пиков вторичных продуктов спиртового брожения.

3. Исследование цитрамалевой кислоты методом тонкослойной хроматографии.

3.1 *Аппаратура*

3.1.1 Стеклянная колонка длиной около 300 мм и внутренним диаметром 10-11 мм, снабженная регулятором потока (запорный кран);

3.1.2 ротационный вакуумный испаритель;

3.1.3 печь на 100 °C;

3.1.4 проявочная камера для хроматографии;

3.1.5 микрометрический шприц или микропипетка.

3.2 *Реагенты*

3.2.1 Раствор муравьиной кислоты, 4 M, содержащий 150,9 мл муравьиной кислоты (ρ_{20} = 1,227 г/мл) на литр;

3.2.2 пластины для хроматографии, готовые к использованию, с нанесенным слоем целлюлозной пудры (например, MN 300) (20 x 20 см).

3.2.3 Растворитель:

*Изо*пропиловый спирт, содержащ. 1 г/л бромфеноловый синий.. 5 об.

Эвкалиптол ..... 5 об.

Муравьиная кислота (U_{20}= 1,227 г/мл) .....2 об.

Растворитель насыщают водой и настаивают перед использованием 24 часа.

3.2.4 стандартные растворы.

Подготавливают водный раствор:

Цитрамалевая кислота ..... 0,25 г/л
Молочная кислота ..... 0,5 г/л
Лимонная кислота ..... 0,5 г/л
Винная кислота ..... 1,0 г/л
Яблочная кислота ..... 1,0 г/л

3.3 *Проведение исследования*

3.3.1 Подготовка ионообменной колонки

См. принятый метод в 3.3.1 в главе *Винная кислота*.

3.3.2 Выделение органических кислот, включая цитрамалевую

Для фиксации органических кислот на ионообменнике следуют принятому методу из 3.3.2, глава *Винная кислота*.

Затем фиксированные кислоты элюируют с помощью 4 М раствора муравьиной кислоты (100 мл), собирая элюат в мерную колбу объемом 100 мл.

Элюат концентрируют досуха в роторном испарителе при 40°C, восстанавливая остаток с помощью 1 мл дистиллированной воды.

3.3.3 Хроматография

Целлюлозную пластину следует активировать, поместив ее на 2 часа в печь при 100°C.

На начальную линию целлюлозной пластины наносят полосой шириной 2 см 10 мкл данного раствора, а также 10 мкл стандартных растворов цитрамалевой кислоты и других органических кислот.

Пластину помещают на 45 минут в хроматографическую ванну над растворителем.

Начинают проявку и дают растворителю мигрировать на высоту 15 см.

3.3.4 Проявка хроматограммы

Пластину выдерживают при температуре окружающей среды под воздушным потоком, пока муравьиная кислота из растворителя не исчезнет. На синем фоне появятся желтые пятна, указывающие на присутствие кислот.

Определяют наличие или отсутствие цитрамалевой кислоты в анализируемом продукте, сравнив пятна полученной хроматограммы с пятнами стандартных растворов цитрамалевой кислоты и других органических кислот.

БИБЛИОГРАФИЯ

Метод скрининга:
HARVALIA A., *F.V., O.I.V.,* 1980, n° 728 bis.

Хроматография цитрамалевой кислоты:
DIMOTAKI-KOURAKOU V., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1960, **53,** 149. DIMOTAKI-KOURAKOU V., *C. R. Ac. Sci.,* Paris 1962, **254,** 4030.
CARLES J., LAMAZOU-BETBEDER M. & PECH M., *C. R. Ac. Sci.,* Paris 1958, **246,** 2160.
CASTINO M., *Riv. Vit. Enol.,* 1967, **6,** 247. KOURAKOU V., *F.V., O.I.V.,* 1977, n° 642. JUNGE Ch *F.V., O.I.V.,* 1978, n° 679. ROUEN J., *F.V., O.I.V.,* 1979, n° 691.

Приложение B

Сертификаты анализов

Правила применения аналитических методов

В рамках контроля качества вин всегда следует предусматривать проведение, с одной стороны, органолептического анализа, а с другой стороны - исследования основных характерных элементов состава вин.

В настоящей книге органолептический анализ не рассматривался, он оставлен на усмотрение каждой страны, однако в любом случае он необходим.

Что касается элементов состава вин, то можно или нужно придерживаться трех типов исследований:

1. Исследования, которые служат для идентификации вин и могут являться основанием для коммерческих сделок (Сертификат № 1).

2. Исследования, которые позволяют удовлетворительно установить качество и характеристики вина и которые, следовательно, соответствуют торговой практике (Сертификат № 2).

В рамках договоров могут быть затребованы исследования, отличные от тех, что предусмотрены в сертификате № 1 и № 2.

3. Может быть предусмотрен третий сертификат (№ 3), в котором будут указаны конкретные исследования, проводимые только в исключительных или особых случаях.

Использование определений, упомянутых в Сертификате № 2, освобождает операторов от ответственности.

Использование определений, упомянутых в Сертификате № 3, освобождает операторов от ответственности.

Когда затрагивается вопрос о здоровье граждан, то МОВВ, государственные ведомства или любые заинтересованные стороны могут запросить проведение других исследований, если в отрасли или среди потребителей возникают серьезные поводы для беспокойства.

Все заинтересованные стороны могут в виде чрезвычайной процедуры заявить об исключительном случае касаемо общественного здоровья специальной группе научных экспертов из Бюро.

Существующие аналитические исследования проводятся в соответствии с методами, описанными в настоящей книге.

Сертификат анализа

Сертификат № 1

- Цвет;
- прозрачность;
- специфическая плотность при 20ºC;
- содержание спирта при 20ºC;
- приведенный экстракт г/л;
- сахар г/л;
- общий диоксид серы мг/л;
- pH;
- общая кислотность мэкв/л;
- летучая кислотность мэкв/л;
- анализ мальвидин-диглюкозида;
- измерение содержания углекислого газа при избыточном давлении в игристых винах;
- дифференциация очень сладкого вина и крепленого сусла в случае сладких вин.

Сертификат № 2

Сертификат № 1 оформлен с учетом следующих пунктов анализа:

- зола и щелочная зола г/л;
- калий г/л;
- железо мг/л;
- медь мг/л;
- свободный диоксид серы мг/л;
- сорбиновая кислота мг/л;
- проверка яблочно-молочного брожения;
- лимонная кислота мг/л;
- винная кислота г/л;
- индекс Фолина – Чокалтеу;
- хроматические индексы;

Следующие пункты анализируются опционально:

- избыточный натрий мг/л;
- кальций, магний мг/л;
- сульфаты мг/л;
- проверка сбраживаемости;
- анализ на искусственные красители.

Приложение C

Максимально допустимые пределы содержания различных веществ

Максимально допустимые пределы содержания в вине различных веществ

(издание 2019 года)

Лимонная кислота:	1 г/л

Летучая кислотность:	20 миллиэквиваленты/л Летучая кислотность различных особо крепленых старых вин (вин, подпадающих под действие специального законодательства и контролируемых правительством) может превышать этот предел.

Мышьяк:	0,2 мг/л

Бор:	80 мг/л (в виде борной кислоты)

Бром:	1 мг/л (в порядке исключения предел повышен для вин с ряда виноградников с солоноватой подпочвой)

Кадмий:	0,01 мг/л

Медь: (oeno 434-2011)	1 мг/л 2 мг/л для ликерных вин, произведенных из неферментированного или слабоферментированного виноградного сусла

Диэтиленгликоль:	≤ 10 мг/л, до предела количественного показателя

Мальвидол диглюкозид:	15 мг/л (определяется количественным методом, описанным в Сборнике)

Серебро:	< 0,1 мг/л

Общий диоксид серы на момент продажи потребителю: (oeno 9/98)	- 150 мг/л для красных вин, содержащих не более 4 г/л редуцирующих веществ; - 200 мг/л для белых и розовых вин, содержащих не более 4 г/л редуцирующих веществ; - 300 мг/л для красных, розовых и белых вин, содержащих более 4 г/л редуцирующих веществ; - 400 мг/л в исключительных случаях для ряда сладких белых вин

Этандиол / этиленгликоль:	≤ 10 мг/л

Флюорид: (oeno 8/91)	1 мг/л за исключением вин, происходящих из виноградников, обрабатываемых криолитом в соответствии с национальным законодательством, в этом случае уровень флюорида не должен превышать 3 мг/л

Метанол: (oeno 19/2004)	400 мг/л для красных вин 250 мг/л для белых и розовых вин

Охратоксин А: (CST 1/2002)	2 мкг/л (для вин, произведенных из урожая 2005 года)

Свинец: (oeno 638/19)	0,10 мг/л для вина, произведенного начиная с 2019 урожайного года 0,15 мг/л для ликерных вин, произведенных начиная с 2019 урожайного года[1]

[1] К ликерным винам, подвергаемым длительной выдержке, применяется предельный показатель, который действовал на момент их производства.

Пропан-1,2-диол/пропиленгликоль: (oeno 20/2003)	Неигристые вина = 150 мг/л Игристые вина = 300 мг/л

Избыточный натрий: (oeno 09/2007)	80 мг/л

Сульфаты: (в виде сульфата калия)	1 г/л Однако данный предельный показатель повышен до 1,5 г/л: - для вин, прошедших ½ периода выдержки в бочках в течение не менее 2 лет; - для подслащенных вин; - для вин, полученных путем добавления к суслу или вину этилового спирта или пищевого спирта. Однако данный предельный показатель повышен до 2,0 г/л: - для вин с добавлением концентрированного сусла; - для натурально сладких вин. Однако данный предельный показатель повышен до 2,5 г/л: - для вин, полученных под пленкой “sous voile”.

Цинк:	5 мг/л

Приложение D

Уведомления

Глюконовая кислота

Резолюция Oeno 4/91

УВЕДОМЛЕНИЕ

Глюконовая кислота всегда присутствует в сусле и винах.

В винах, полученных из хорошего, зрелого урожая, ее уровень не превышает 200 - 300 мг/л.

Содержание глюконовой кислоты увеличивается в результате перезревания, при изюмном созревании и, особенно, под воздействием *Botrytis cinerea*.

Более высокие показатели ее присутствия в винах - кроме вин, зараженных благородной гнилью, для которой глюконовая кислота является характерным компонентом - не могут считаться признаком плохого качества из-за использования урожая винограда, пораженного серой гнилью, что должно быть доказано другими способами.
На самом деле, при использовании соответствующих методов винификации в этом случае можно получить качественные вина.

Что касается фальсификации путем добавления глюконовой кислоты, то это не следует принимать во внимание, поскольку для этого нет никаких оснований.

Характеристики вин, полученных избыточным прессованием

Резолюция Oeno 5/91

УВЕДОМЛЕНИЕ

Исходя из результатов обсуждений, посвященных испытаниям ОПИСАТЕЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВИН, ПОЛУЧЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ИЗБЫТОЧНОГО ПРЕССОВАНИЯ, эксперты подтвердили, что при проведении группы испытаний поведение вин сильно отличается в зависимости от сорта, что делает невозможным любую интерпретацию вин, полученных из нескольких сортов.

Кроме того, необходимо учитывать то влияние, которое оказывают различные методы прессования и винификации, например, предварительная мацерация.

Необходимо продолжать исследования, чтобы выявить вина, полученные при избыточном прессовании, и найти определение избыточному прессованию.

Уровень содержания в винах ионов натрия и хлорида

Резолюция Oeno 6/91

УВЕДОМЛЕНИЕ

Уровень содержания ионов Cl^- и ионов Na^+в винах зависит в значительной мере от географических, геологических и климатических условий виноградной культуры.

Как правило, уровень содержания данных ионов низкий.

Содержание этих элементов повышается в винах, происходящих с виноградников, которые расположены вблизи морского побережья и имеют солоноватые подпочвы или засушливую почву, орошаемую соленой водой, поэтому молярное отношение cf Cl^-/Na^+ значительно варьируется и даже может иметь значение, близкое к единице (1), что может означать добавление в вино соли (NaCl).

Когда вино содержит избыток натрия (избыток натрия равен содержанию ионов натрия за вычетом содержания ионов хлорида, выраженных в виде натрия), уровень обычно составляет менее 60 мг/л, этот предельный показатель может быть превышен в исключительных случаях.

Столкнувшись с повышенным содержанием Cl^- и/или Na^+, лаборатории и официальные органы контроля должны принять во внимание вышеуказанные выводы и, возможно, сделать соответствующий запрос в официальные органы страны *происхождения*, прежде чем исключать эти вина из оборота.

Приложение E

Порядок обеспечения качества в лабораториях

Порядок утверждения общепринятых методов по оттношению к эталонным методам

(Резолюция Oeno 7/98)

В дополнение к методам, описанным в Своде международных методов анализа вин и сусел, МОВВ признает существование общепринятых, часто автоматизированных методов. Эти методы имеют важное экономическое и коммерческое значение, поскольку позволяют поддерживать полноценную и эффективную аналитическую основу для производства и маркетинга вина. Кроме того, эти методы позволяют использовать современные средства анализа, а также разрабатывать и адаптировать различные способы анализа.

Для того чтобы позволить лабораториям использовать эти методы и увязать их с методами, описанными в Сборнике, МОВВ решает установить для лабораторий протокол оценки и утверждения обычных альтернативных, механизированных или не механизированных методов в привязке к эталонному методу, описанному в Сборнике международных методов анализа вин и сусел.

Принцип, который будет адаптирован к конкретной ситуации анализа вин и сусел, будет опираться на текущие международные стандарты и позволит лабораториям оценивать и утверждать свой альтернативный метод двумя способами:

Совместное исследование

Цель совместного исследования - предоставить количественные показатели относительно прецизионности аналитического метода, выраженной через повторяемость *r* и воспроизводимость *R*.

Повторяемость: показатель, ниже которого расположена с определенной вероятностью абсолютная разность между двумя результатами единичных тестов, полученных в условиях воспроизводимости (то есть, та же проба, тот же лаборант, та же аппаратура, та же лаборатория и короткий временной интервал).

Воспроизводимость: показатель, ниже которого расположена с определенной вероятностью абсолютная разность между результатами единичных тестов, полученных в условиях воспроизводимости (то есть, на идентичном материале, полученном лаборантами в различных лабораториях, при использовании стандартизированного метода испытаний).

Термин "единичный результат" обозначает значение, полученное при однократном и полном применении стандартизованного метода испытания к одной пробе. Если не указано иное, то вероятность составляет 95%.

Общие принципы

- Метод, подвергаемый испытанию, должен быть стандартизирован, т. е. выбран из существующих методов как наиболее подходящий для последующего общего использования.
- Протокол должен быть ясным и выверенным.
- Лабораторий-участников должно быть не меньше десяти.
- Пробы для испытаний должны быть взяты из однородных партий материала.
- Содержание анализируемого компонента должно соответствовать концентрациям, обычно встречающимся на практике.
- У участников должен быть хороший опыт применения технологии.
- Для каждого участника: все анализы должны проводиться в одной лаборатории, одним и тем же оператором.
- Следует неукоснительно придерживаться метода. Любое отклонение от описанного метода подлежит документированию.
- Экспериментальные величины должны быть определены в сугубо одинаковых условиях: на аппаратах одного типа и т.д.
- Они должны быть определены независимо друг от друга и непосредственно друг за другом.

- Все лаборатории предоставляют результаты в одних и тех же единицах, с одинаковым количеством знаков после запятой.
- Необходимо определить пять повторных экспериментальных величин, без выбросов. Если по тесту Граббса экспериментальное значение является выбросом, проводят три дополнительных измерения.

Статистическая модель

Статистические методы, изложенные в настоящем документе, приведены для одного уровня (концентрация, проба). Если имеется несколько уровней, статистическая оценка должна проводиться отдельно для каждого из них. Если обнаружена линейная зависимость ($y = bx$ или $y = a + bx$) между повторяемостью (r) или воспроизводимостью (R) и концентрацией ($\bar{\bar{x}}$), можно провести регрессию r (или R) в зависимости от $\bar{\bar{x}}$.

Статистические методы, приведенные ниже, подразумевают распределённые по нормальному закону случайные величины. Необходимо выполнить следующие шаги:

A/ В пределах одной лаборатории с помощью теста Граббса устраняют выбросы. Выбросы - это значения, которые настолько существенно отличаются от других экспериментальных значений, что эти отклонения не могут считаться случайными, если их причины неизвестны.

B/ Проверяют, все ли лаборатории работают с одинаковой прецизионностью, для чего сравнивают дисперсии, применяя критерии Бартлетта и Кохрана. Исключают те лаборатории, по которым получены статистически отклоняющиеся значения.

C/ Систематические ошибки оставшихся лабораторий отслеживают с помощью дисперсионного анализа; и с помощью теста Диксона определяют экстремальные значения выбросов. Исключают те лаборатории, по которым значения выбросов значительны.

D/ Из оставшихся результатов рассчитывают стандартное отклонение повторяемости *Sr* и повторяемости *r*, стандартное отклонение воспроизводимости S_R и воспроизводимости *R*.

Система обозначения:

Были выбраны следующие обозначения:

m	количество лабораторий
$i (i = 1, 2... m)$	индекс (номер лаборатории)
n_i	количество отдельных значений из $i^{-ой}$ лаборатории
$N = \sum_{i=1}^{m} n_i$	общее число отдельных значений

$x(i = 1, 2... n_i)$	отдельное значение из *i-ой* лаборатории
$\bar{x}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{i=1}^{n_i} x_i$	среднее значение из *i-ой* лаборатории
$\bar{\bar{x}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{m} \sum_{i=1}^{n_i} x_i$	общее среднее значение
$s_i = \sqrt{\frac{1}{n_i - 1} \sum_{i=1}^{n_i} \left(x_i - \bar{x}_i\right)^2}$	стандартное отклонение из *i-ой* лаборатории

A/ ***Проверка значений выбросов в пределах одной лаборатории***

После определения пяти отдельных значений x_i в лаборатории проводят тест Граббса с целью установить значения выбросов.
Проверяют нулевую гипотезу о том, что экспериментальное значение с наибольшим абсолютным отклонением от среднего не является выбросом наблюдения.

Рассчитать PG = $\frac{|x_i^* - \bar{x}_i|}{s_i}$

x_i^* = сомнительное значение

PG сравнивают с соответствующим значением, указанным в Таблице 1 при P = 95%.
Если PG < указанного значения, то значение x_i^* не является выбросом, и s_i может быть вычислено.
Если PG > указанного значения, то значение x_i^* вероятно является выбросом, поэтому требуется еще три определения.
Проводят тест Граббса для x_i^* с восемью определениями.
Если PG > соответствующего значения при P = 99%, то x_i^* рассматривают в качестве отклоняющегося от нормы значения и рассчитывают s_i без x_i^*.

B/ Сравнение отклонений между лабораториями – критерий Бартлетта

Критерий Бартлетта позволяет исследовать как большие, так и малые дисперсии. Он служит для проверки нулевой гипотезы о равенстве дисперсий во всех лабораториях, в отличие от альтернативной гипотезы, согласно которой дисперсии не равны в некоторых лабораториях.
Для каждой лаборатории требуется не менее пяти отдельных значений.
Рассчитывают статистику критерия:

$$PB=\frac{1}{C}\left[(N-\mathrm{m})\ln S_r^2-\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{m}}\mathrm{f_i}\ln \mathrm{s_i^2}\right]$$

$$C=\frac{\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{m}}\frac{1}{\mathrm{f_i}}-\frac{1}{N-\mathrm{m}}}{3(\mathrm{m}-1)}+1$$

$$S_r^2=\frac{\sum_{i=1}^{m}\mathrm{f_i}s_I^2}{N-\mathrm{m}}$$

$fi = ni$ - 1 степени свободы s_i.
Сравнивают РВ со значением x^2, указанным в таблице 2 для m - 1 степени свободы. Если РВ > значения из таблицы, то между дисперсиями имеются различия.
Критерий Кохрана используется для подтверждения того, что дисперсия от одной лаборатории больше дисперсии от других лабораторий.
Рассчитывают статистику критерия:

$$PC=\frac{\mathrm{s_i^2max}}{\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{m}}\mathrm{s_i^2}}$$

Сравнивают РС со значением, указанным в таблице 3 для m и n_i при Р = 99%. Если РС > значения из таблицы, то дисперсия значительно больше, чем другие.
Если критерии Бартлетта или Кохрана показывают существенный результат, то дисперсию выброса удаляют и заново рассчитывают статистический критерий.
При отсутствии статистического метода, подходящего для одновременной проверки нескольких значений выбросов, допускается повторное применение критериев, но с осторожностью.
Если дисперсии лабораторий резко отличаются друг от друга, необходимо провести расследование, чтобы выявить причины и решить, следует ли исключать экспериментальные значения, полученные этими лабораториями, или нет. Если их следует исключить, то координатор должен рассмотреть вопрос о том, насколько репрезентативны оставшиеся лаборатории.

Если статистический анализ показывает, что существуют различные дисперсии, это свидетельствует о том, что лаборатории использовали методы различной степени точности. Это может быть связано с некорректными процедурами, отсутствием ясности или неправильным описанием метода.

C/ ***Систематические ошибки***

Систематические ошибки, допускаемые лабораториями, выявляются методом Фишера или тестом Диксона.

Дисперсионный анализ Р.А. Фишера
Этот тест применяют к оставшимся экспериментальным значениям из лабораторий с одинаковой дисперсией.
Тест помогает установить, является ли разброс средних значений из лабораторий намного большим, чем разброс отдельных значений, выраженный дисперсией между лабораториями (s^2_z) или дисперсией внутри лабораторий (s^2_i).

Рассчитывают статистику теста:

$$PF = \frac{s_Z^2}{s_I^2}$$

$$s_Z^2 = \frac{1}{m\text{-}1}\sum_{i=1}^{m} n_i\left(\bar{x}_i - \bar{\bar{x}}\right)^2$$

$$s_I^2 = \frac{1}{N-m}\sum_{i=1}^{m}\sum_{i=1}^{n_i}\left(x_i - \bar{x}_i\right)^2$$

Сравнивают PF с соответствующим значением, приведенным в таблице 4 (распределение F), где $f_i = f_Z = m$ - 1 и $f2 = f1$ = N - m степени свободы.

Если PF > значения из таблицы, то можно сделать вывод о наличии различий между средними значениями, то есть о наличии систематических ошибок.

Тест Диксона

Этот тест позволяет подтвердить, что среднее значение, полученное в одной лаборатории, больше или меньше, чем в других лабораториях.
Берут ряд данных $Z(h)$, h = 1,2,3...H, расположенных в порядке возрастания. Рассчитывают статистику теста:

от 3 до 7	$Q_{10} = \frac{Z(2)-Z(1)}{Z(H)-Z(1)}$	или	$\frac{Z(H)-Z(H-1)}{Z(H)-Z(1)}$
от 8 до 12	$Q_{11} = \frac{Z(2)-Z(1)}{Z(H-1)-Z(1)}$	или	$\frac{Z(H)-Z(H-1)}{Z(H)-Z(2)}$
от 13 и выше	$Q_{22} = \frac{Z(3)-Z(1)}{Z(H-2)-Z(1)}$	или	$\frac{Z(H)-Z(H-2)}{Z(H)-Z(3)}$

Наибольшее значение Q сравнивают с критическими значениями, приведенными в таблице 5.
Если тестовая статистика > значения из таблицы при P = 95%, то рассматриваемое среднее значение можно считать выбросом.

Если при дисперсионном анализе Р.А. Фишера или тесте Диксона получен значимый результат, одно из крайних значений отбрасывают и снова рассчитывают тестовую статистику с оставшимися значениями. Касательно повторного применения тестов см. пояснения в пункте (B).
Если обнаружены систематические ошибки, соответствующие экспериментальные значения не должны включаться в последующие расчеты; необходимо выяснить причину систематической ошибки.

D/ Расчет повторяемости (r) и воспроизводимости (R)

Из результатов, оставшихся после устранения выбросов, вычисляют стандартное отклонение повторяемости s_r и повторяемости r, а также стандартное отклонение воспроизводимости s_R и воспроизводимости R, которые представлены как характерные значения аналитического метода.

$$s_r=\sqrt{\frac{1}{N-m}\sum_{i=1}^{m} f_i s_i^2} \qquad r=s_r\cdot 2\sqrt{2}$$

$$s_R=\sqrt{\frac{1}{a}\left[s_Z^2+(a-1)s_I^2\right]} \qquad R=s_R\cdot 2\sqrt{2}$$

$$a=\frac{1}{m-1}\left[\left(N-\sum_{i=1}^{m}\frac{n_i^2}{N}\right)\right]$$

Если нет различий между лабораторными значениями, то нет различий между s_r и s_R или между r и R. Но если между лабораторными средними значениями различия находятся, пусть и допустимые по практическим соображениям, необходимо указать s_r и s_R, r и R.

БИБЛИОГРАФИЯ

Стандарт AFNOR, NFX06041, *Точность методов испытаний. Определение повторяемости и воспроизводимости с помощью межлабораторных испытаний.*

DAVIES O. L., GOLDSMITH P.l., *Statistical Methods in Research and Production,* Oliver and Boyd, Edinburgh, 1972.

GOETSCH F. H., KRÖNERT W., OLSCHIMKE D., OTTO U., VIERKÖTTER S., *Meth. An.,* 1978, No 667.

GOTTSCHALK G., KAISER K. E., *Einführung in die Varianzanalyse und Ringversuche,* B-1 Hoschultaschenbücher, Band 775, 1976.

GRAF, HENNING, WILRICH, *Statistische Methoden bei textile Untersuchungen,* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974.

GRUBBS F. E., *Sample Criteria for Testing Outlying Observations,* The Annals of Mathematical Statistics, 1950, vol. 21, p 27-58.

GRUBBS F. E., *Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples,* Technometrics, 1969, vol. 11, No 1, p 1-21.

GRUBBS F. E. and BECK G., *Extension of Sample Sizes and Percentage Points for Significance Tests of Outlying Observations,* Technometrics, 1972, vol. 14, No 4, p 847-854.

Стандарт ISO, 5725.

KAISER R., GOTTSCHALK G., *Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten,* B-I Hochschultaschenbücher, Band 774, 1972.

LIENERT G. A., *Verteilungsfreie Verfahren in der Biostatistik,* Band I, Verlag Anton Haine, Meisenheim am Glan, 1973.

NALIMOV V. V., *The Application of Mathematical Statistics to Chemical Analysis,* Pergamon Press, Oxford, London, Paris, Frankfurt, 1963.

SACHS L., *Statistische Auswertungsmethoden,* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.

Таблица 1 – Критические значения для теста Граббса

n_i	P = 95%	P 99%
3	1,155	1,155
4	1,481	1,496
5	1,715	1,764
6	1,887	1,973
7	2,020	2,139
8	2,126	2,274
9	2,215	2,387
10	2,290	2.482
11	2,355	2.564
12	2,412	2,636

Таблица 2 – Критические значения для критерия Бартлетта (P = 95%)

f(m - 1)	X^2	*f(m - 1)*	X^2
1	3,84	21	32,7
2	5,99	22	33,9
3	7,81	23	35,2
4	9,49	24	36,4
5	11,07	25	37,7
6	12,59	26	38,9
7	14,07	27	40,1
8	15,51	28	41,3
9	16,92	29	42,6
10	18,31	30	43,8
11	19,68	35	49,8
12	21,03	40	55,8
13	22,36	50	67,5
14	23,69	60	79,1
15	25,00	70	90,5
16	26,30	80	101,9
17	27,59	90	113,1
18	28,87	100	124,3
19	30,14		
20	31,41		

Таблица 3 – Критические значения для критерия Кохрана

m	$n_i = 2$		$n_i = 3$		$n_i = 4$		$n_i = 5$		$n_i = 6$	
	99%	95%	99%	95%	99%	95%	99%	95%	99%	95%
2	-	-	0.995	0.975	0.979	0.939	0.959	0.906	0.937	0.877
3	0.993	0.967	0.942	0.871	0.883	0.798	0.834	0.746	0.793	0.707
4	0.968	0.906	0.864	0.768	0.781	0.684	0.721	0.629	0.676	0.590
5	0.928	0.841	0.788	0.684	0.696	0.598	0.633	0.544	0.588	0.506
6	0.883	0.781	0.722	0.616	0.626	0.532	0.564	0.480	0.520	0.445
7	0.838	0.727	0.664	0.561	0.568	0.480	0.508	0.431	0.466	0.397
8	0.794	0.680	0.615	0.516	0.521	0.438	0.463	0.391	0.423	0.360
9	0.754	0.638	0.573	0.478	0.481	0.403	0.425	0.358	0.387	0.329
10	0.718	0.602	0.536	0.445	0.447	0.373	0.393	0.331	0.357	0.303
11	0.684	0.570	0.504	0.417	0.418	0.348	0.366	0.308	0.332	0.281
12	0.653	0.541	0.475	0.392	0.392	0.326	0.343	0.288	0.310	0.262
13	0.624	0.515	0.450	0.371	0.369	0.307	0.322	0.271	0.291	0.246
14	0.599	0.492	0.427	0.352	0.349	0.291	0.304	0.255	0.274	0.232
15	0.575	0.471	0.407	0.335	0.332	0.276	0.288	0.242	0.259	0.220
16	0.553	0.452	0.388	0.319	0.316	0.262	0.274	0.230	0.246	0.208
17	0.532	0.434	0.372	0.305	0.301	0.250	0.261	0.219	0.234	0.198
18	0.514	0.418	0.356	0.293	0.288	0.240	0.249	0.209	0.223	0.189
19	0.496	0.403	0.343	0.281	0.276	0.230	0.238	0.200	0.214	0.181
20	0.480	0.389	0.330	0.270	0.265	0.220	0.229	0.192	0.205	0.174
21	0.465	0.377	0.318	0.261	0.255	0.212	0.220	0.185	0.197	0.167
22	0.450	0.365	0.307	0.252	0.246	0.204	0.212	0.178	0.189	0.160
23	0.437	0.354	0.297	0.243	0.238	0.197	0.204	0.172	0.182	0.155
24	0.425	0.343	0.287	0.235	0.230	0.191	0.197	0.166	0.176	0.149
25	0.413	0.334	0.278	0.228	0.222	0.185	0.190	0.160	0.170	0.144
26	0.402	0.325	0.270	0.221	0.215	0.179	0.184	0.155	0.164	0.140
27	0.391	0.316	0.262	0.215	0.209	0.173	0.179	0.150	0.159	0.135
28	0.382	0.308	0.255	0.209	0.202	0.168	0.173	0.146	0.154	0.131
29	0.372	0.300	0.248	0.203	0.196	0.164	0.168	0.142	0.150	0.127
30	0.363	0.293	0.241	0.198	0.191	0.159	0.164	0.138	0.145	0.124
31	0.355	0.286	0.235	0.193	0.186	0.155	0.159	0.134	0.141	0.120
32	0.347	0.280	0.229	0.188	0.181	0.151	0.155	0.131	0.138	0.117
33	0.339	0.273	0.224	0.184	0.177	0.147	0.151	0.127	0.134	0.114
34	0.332	0.267	0.218	0.179	0.172	0.144	0.147	0.124	0.131	0.111
35	0.325	0.262	0.213	0.175	0.168	0.140	0.144	0.121	0.127	0.108
36	0.318	0.256	0.208	0.172	0.165	0.137	0.140	0.119	0.124	0.106
37	0.312	0.251	0.204	0.168	0.161	0.134	0.137	0.116	0.121	0.103
38	0.306	0.246	0.200	0.164	0.157	0.131	0.134	0.113	0.119	0.101
39	0.300	0.242	0.196	0.161	0.154	0.129	0.131	0.111	0.116	0.099
40	0.294	0.237	0.192	0.158	0.151	0.126	0.128	0.108	0.114	0.097

Таблица 4 – Критические значения для теста-F (P=99%)

f_2 \ f_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	4052	4999	5403	5625	5764	5859	5928	5981	6023	6056	6083	6106	6126	6143	6157
2	98.5	99.0	99.2	99.3	99.3	99.3	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
3	34.1	30.8	29.4	28.7	28.2	27.9	27.7	27.5	27.3	27.2	27.1	27.1	27.0	26.9	26.9
4	21.2	18.0	16.7	16.0	15.5	15.2	15.0	14.8	14.7	14.5	14.5	14.4	14.3	14.2	14.2
5	16.3	13.3	12.1	11.4	11.0	10.7	10.5	10.3	10.2	10.1	9.96	9.89	9.82	9.77	9.72
6	13.7	10.9	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72	7.66	7.60	7.56
7	12.2	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.54	6.47	6.41	6.36	6.31
8	11.3	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.73	5.67	5.61	5.56	5.52
9	10.6	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11	5.05	5.01	4.96
10	10.0	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.77	4.71	4.65	4.60	4.56
11	9.64	7.20	6.21	5.67	5.31	5.07	4.88	4.74	4.63	4.54	4.46	4.39	4.34	4.29	4.25
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.22	4.16	4.10	4.05	4.01
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	4.02	3.96	3.90	3.86	3.82
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.75	3.70	3.66
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.61	3.56	3.52
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.62	3.55	3.50	3.45	3.41
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.46	3.40	3.35	3.31
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.43	3.37	3.32	3.27	3.23
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.24	3.19	3.15
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.29	3.23	3.18	3.13	3.09
21	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40	3.31	3.24	3.17	3.12	3.07	3.03
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.18	3.12	3.07	3.02	2.98
23	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.14	3.07	3.02	2.97	2.93
24	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.09	3.03	2.98	2.93	2.89
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	3.06	2.99	2.94	2.89	2.85
26	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18	3.09	3.02	2.96	2.90	2.86	2.81
27	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15	3.06	2.99	2.93	2.87	2.82	2.78
28	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12	3.03	2.96	2.90	2.84	2.79	2.75
29	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09	3.00	2.93	2.87	2.81	2.77	2.73
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.91	2.84	2.79	2.74	2.70
40	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89	2.80	2.73	2.66	2.61	2.56	2.52
50	7.17	5.06	4.20	3.72	3.41	3.19	3.02	2.89	2.78	2.70	2.62	2.56	2.51	2.46	2.42
60	7.07	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.56	2.50	2.44	2.39	2.35
70	7.01	4.92	4.07	3.60	3.29	3.07	2.91	2.78	2.67	2.59	2.51	2.45	2.40	2.35	2.31
80	6.96	4.88	4.04	3.56	3.25	3.04	2.87	2.74	2.64	2.55	2.48	2.42	2.36	2.31	2.27
90	6.92	4.85	4.01	3.53	3.23	3.01	2.84	2.72	2.61	2.52	2.45	2.39	2.33	2.29	2.24
100	6.89	4.82	3.98	3.51	3.21	2.99	2.82	2.69	2.59	2.50	2.43	2.37	2.31	2.27	2.22
200	6.75	4.71	3.88	3.41	3.11	2.89	2.73	2.60	2.50	2.41	2.34	2.27	2.22	2.17	2.13
500	6.69	4.65	3.82	3.36	3.05	2.84	2.68	2.55	2.44	2.36	2.29	2.22	2.17	2.12	2.07
	6.63	4.61	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41	2.32	2.25	2.18	2.13	2.08	2.04

Таблица 4 – Критические значения для теста-F (P=99%) [продолжение]

f_2 \ f_1	16	17	18	19	20	30	40	50	60	70	80	100	200	500	
1	6169	6182	6192	6201	6209	6261	6287	6303	6313	6320	6326	6335	6350	6361	6366
2	99.4	99.4	99.4	99.4	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.3	99.5	99.5
3	26.8	26.8	26.8	26.7	26.7	26.5	26.4	26.4	26.3	26.3	26.3	26.2	26.2	26.1	26.1
4	14.2	14.1	14.1	14.0	14.0	13.8	13.7	13.7	13.7	13.6	13.6	13.6	13.5	13.5	13.5
5	9.68	9.64	9.61	9.58	9.55	9.38	9.29	9.24	9.20	9.18	9.16	9.13	9.08	9.04	9.02
6	7.52	7.48	7.45	7.42	7.40	7.23	7.14	7.09	7.06	7.03	7.01	6.99	6.93	6.90	6.88
7	6.28	6.24	6.21	6.18	6.16	5.99	5.91	5.86	5.82	5.80	5.78	5.75	5.70	5.67	5.65
8	5.48	5.44	5.41	5.38	5.36	5.20	5.12	5.07	5.03	5.01	4.99	4.96	4.91	4.88	4.86
9	4.92	4.89	4.86	4.83	4.81	4.65	4.57	4.52	4.48	4.46	4.44	4.41	4.36	4.33	4.31
10	4.52	4.49	4.46	4.43	4.41	4.25	4.17	4.12	4.08	4.06	4.04	4.01	3.96	3.93	3.91
11	4.21	4.18	4.15	4.12	4.10	3.94	3.86	3.81	3.77	3.75	3.73	3.70	3.65	3.62	3.60
12	3.97	3.94	3.91	3.88	3.86	3.70	3.62	3.57	3.54	3.51	3.49	3.47	3.41	3.38	3.36
13	3.78	3.74	3.72	3.69	3.66	3.51	3.42	3.37	3.34	3.32	3.30	3.27	3.22	3.19	3.17
14	3.62	3.59	3.56	3.53	3.51	3.35	3.27	3.22	3.18	3.16	3.14	3.11	3.06	3.03	3.00
15	3.49	3.45	3.42	3.40	3.37	3.21	3.13	3.08	3.05	3.02	3.00	2.98	2.92	2.89	2.87
16	3.37	3.34	3.31	3.28	3.26	3.10	3.02	2.97	2.93	2.91	2.89	2.86	2.81	2.78	2.75
17	3.27	3.24	3.21	3.19	3.16	3.00	2.92	2.87	2.83	2.81	2.79	2.76	2.71	2.68	2.65
18	3.19	3.16	3.13	3.10	3.08	2.92	2.84	2.78	2.75	2.72	2.70	2.68	2.62	2.59	2.57
19	3.12	3.08	3.05	3.03	3.00	2.84	2.76	2.71	2.67	2.65	2.63	2.60	2.55	2.51	2.49
20	3.05	3.02	2.99	2.96	2.94	2.78	2.69	2.64	2.61	2.58	2.56	2.54	2.48	2.44	2.42
21	2.99	2.96	2.93	2.90	2.88	2.72	2.64	2.58	2.55	2.52	2.50	2.48	2.42	2.38	2.36
22	2.94	2.91	2.88	2.85	2.83	2.67	2.58	2.53	2.50	2.47	2.45	2.42	2.36	2.33	2.31
23	2.89	2.86	2.83	2.80	2.78	2.62	2.54	2.48	2.45	2.42	2.40	2.37	2.32	2.28	2.26
24	2.85	2.82	2.79	2.76	2.74	2.58	2.49	2.44	2.40	2.38	2.36	2.33	2.27	2.24	2.21
25	2.81	2.78	2.75	2.72	2.70	2.54	2.45	2.40	2.36	2.34	2.32	2.29	2.23	2.19	2.17
26	2.78	2.75	2.72	2.69	2.66	2.50	2.42	2.36	2.33	2.30	2.28	2.25	2.19	2.16	2.13
27	2.75	2.71	2.68	2.66	2.63	2.47	2.38	2.33	2.29	2.27	2.25	2.22	2.16	2.12	2.10
28	2.72	2.68	2.65	2.63	2.60	2.44	2.35	2.30	2.26	2.24	2.22	2.19	2.13	2.09	2.06
29	2.69	2.66	2.63	2.60	2.57	2.41	2.33	2.27	2.23	2.21	2.19	2.16	2.10	2.06	2.03
30	2.66	2.63	2.60	2.57	2.55	2.39	2.30	2.25	2.21	2.18	2.16	2.13	2.07	2.03	2.01
40	2.48	2.45	2.42	2.39	2.37	2.20	2.11	2.06	2.02	1.99	1.97	1.94	1.87	1.85	1.80
50	2.38	2.35	2.32	2.29	2.27	2.10	2.01	1.95	1.91	1.88	1.86	1.82	1.76	1.71	1.68
60	2.31	2.28	2.25	2.22	2.20	2.03	1.94	1.88	1.84	1.81	1.78	1.75	1.68	1.63	1.60
70	2.27	2.23	2.20	2.18	2.15	1.98	1.89	1.83	1.78	1.75	1.73	1.70	1.62	1.57	1.54
80	2.23	2.20	2.17	2.14	2.12	1.94	1.85	1.79	1.75	1.71	1.69	1.65	1.58	1.53	1.49
90	2.21	2.17	2.14	2.11	2.09	1.92	1.82	1.76	1.72	1.68	1.66	1.62	1.55	1.50	1.46
100	2.19	2.15	2.12	2.09	2.07	1.89	1.80	1.74	1.69	1.66	1.63	1.60	1.52	1.47	1.43
200	2.09	2.06	2.03	2.00	1.97	1.79	1.69	1.63	1.58	1.55	1.52	1.48	1.39	1.33	1.28
500	2.04	2.00	1.97	1.94	1.92	1.74	1.63	1.56	1.52	1.48	1.45	1.41	1.31	1.23	1.16
	2.00	1.97	1.93	1.90	1.88	1.70	1.59	1.52	1.47	1.43	1.40	1.36	1.25	1.15	1.00

Таблица 5 – Критические значения для теста Диксона

Критерий теста		Критические значения	
	m	95%	99%
$Q_{10} = \frac{Z(2) \pm Z(1)}{Z(H) \pm Z(1)}$ или $\frac{Z(H) \pm Z(H \pm 1)}{Z(H) \pm Z(1)}$ Наибольшее из двух значений	3	0,970	0,994
	4	0,829	0,926
	5	0,710	0,821
	6	0,628	0,740
	7	0,569	0,680
$Q_{11} = \frac{Z(2) \pm Z(1)}{Z(H \pm 1) \pm Z(1)}$ или $\frac{Z(H) \pm Z(H \pm 1)}{Z(H) \pm Z(2)}$ Наибольшее из двух значений	8	0,608	0,717
	9	0,564	0,672
	10	0,530	0,635
	11	0,502	0,605
	12	0,479	0,579
$Q_{22} = \frac{Z(3) \pm Z(1)}{Z(H \pm 2) \pm Z(1)}$ или $\frac{Z(H) \pm Z(H \pm 2)}{Z(H) \pm Z(3)}$ Наибольшее из двух значений	13	0,611	0,697
	14	0,586	0,670
	15	0,565	0,647
	16	0,546	0,627
	17	0,529	0,610
	18	0,514	0,594
	19	0,501	0,580
	20	0,489	0,567
	21	0,478	0,555
	22	0,468	0,544
	23	0,459	0,535
	24	0,451	0,526
	25	0,443	0,517
	26	0,436	0,510
	27	0,429	0,502
	28	0,423	0,495
	29	0,417	0,489
	30	0,412	0,483
	31	0,407	0,477
	32	0,402	0,472
	33	0,397	0,467
	34	0,393	0,462
	35	0,388	0,458
	36	0,384	0,454
	37	0,381	0,450
	38	0,377	0,446
	39	0,374	0,442
	40	0,371	0,438

Таблица 6 – Результаты совместного исследования

Анализ										Проба				
Лаб. №	Отдельные значения x_1													
	1	2	3	4	5	6	7	8		n_1	x_1	s_1	s^2_1	
1	548	556	558	553	542					5	551	6,47	41,8	
2	300	299	304	308	300					5	302	3,83	14,7	$x_{1,<}x$
3	567	558	563	532*	560	560	563	567		7	563	3,51	12,3	
4	557	550	555	560	551					5	555	4,16	17,3	
5	569	575	565	560	572					5	568	5,89	34,7	
6	550	546	549	557	588	570	576	568		8	563	14,92	222,6	$s_1 > s_1$
7	557	560	560	552	547					5	555	5,63	31,7	
8	548	543	560	551	548					5	550	6,28	39,5	
9	558	563	551	555	560					5	556	5,63	31,7	
10	554	559	551	545	557					5	553	5,5	30,2	

Статистические показатели:

В пределах лабор-ии: $s_1 = \pm 5.37$ $f_{1=34}$

Между лабор-ми.: $s_z = \pm 13.97$ $fz =$

$s_r = \pm 5.37$ $r = 15$ $s_R = \pm 7.78$ R = 22

Критерий Бартлетта:

PB = 3.16 < 15.51 (95%; $f = 8$)

Анализ дисперсий:

PF =6.76 ≻ 3.21 (99%; $f_1 = 7$; $f_2 = 34$)

Надежность результатов анализа

(Резолюция Oeno
5/99)

Полученные в ходе совместных исследований сведения о надежности аналитических методов применимы в следующих случаях:

1) проверка результатов, полученных лабораторией с помощью эталонного метода;
2) оценка результатов анализа, которые указывают на превышение допустимого предела;
3) сравнение результатов, полученных двумя или более лабораториями, и сравнение этих результатов с эталонным значением;
4) оценка результатов, полученных невалидированным методом.

1) ПРОВЕРКА ПРИЕМЛЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ЭТАЛОННОГО МЕТОДА

Достоверность результатов анализа зависит от следующих условий:

- лаборатория должна выполнять все анализы в рамках соответствующей системы контроля качества, включая организацию, обязанности, процедуры и т.д.;
- в рамках системы контроля качества лаборатория должна работать с соблюдением внутренней Инструкции по контролю качества;
- получаемые результаты должны соответствовать критериям, изложенным во внутренней Инструкции по контролю качества.

Внутренний контроль качества должен быть организован в соответствии с международно признанными стандартами, например теми, что изложены в документе Международного союза теоретической и прикладной химии ("IUPAC") под названием "Гармонизированное руководство по внутреннему контролю качества в аналитических лабораториях".

Внутренний контроль качества подразумевает анализ эталонного материала.

Эталонные пробы должны состоять из шаблона анализируемых проб и содержать соответствующую известную концентрацию анализируемого вещества, аналогичную той, которая присутствует в пробе.

Эталонный материал должен по возможности пройти сертификацию в международно признанной организации.

Тем не менее, для многих видов анализа не существует сертифицированных эталонных материалов. В таком случае можно использовать, например, материал, проанализированный несколькими лабораториями в рамках проверки компетентности, и считать среднее значение результатов значением, присвоенным анализируемому веществу.

Также эталонный материал можно приготовить по рецептуре (типовой раствор с известными компонентами) или путем добавления известного количества анализируемого вещества к пробе, который не содержит (или еще не содержит) это вещество по результатам теста на извлечение (дозированного добавления), проведенного на одной из анализируемых проб.

Контроль качества обеспечивается путем добавления эталонного материала к каждой серии проб и проведения анализа этих пар (испытуемые пробы и эталонный материал). Тем самым проверяют, насколько правильно применен метод. Процесс не должен зависеть от калибровки и протокола анализа, поскольку его целью является проверка вышеупомянутого.

Серия - ряд проб, проанализированных в условиях повторяемости. Внутренний контроль помогает не допустить превышения соответствующего уровня неопределенности.

Если результаты анализа рассматриваются как часть совокупности, имеющей нормальное распределение, среднее значение которой равно m, а стандартное отклонение равно s, то только приблизительно 0,3% результатов будут выходить за пределы $m \pm 3s$. При получении отклоняющихся от нормы результатов (вне этих пределов) считается, что система находится вне статистического контроля (ненадежные данные).

На контрольной карте Шухарта результат контроля получает графическое отображение. Для получения графиков измеренные значения эталонного материала отмечают на вертикальной оси, а номера серий - на горизонтальной. На графике также имеются горизонтальные линии, обозначающие среднее значение, m, $m \pm 2$ (пределы предупреждения) и $m \pm 3$ (пределы действия) (рис. 1).

Для оценки стандартного отклонения контрольная проба должна быть проанализирован дважды, не менее чем в 12 испытаниях. Каждая аналитическая пара должна быть проанализирована в условиях повторяемости и случайным образом введена в серию проб. Анализы дублируют в разные дни, чтобы отразить обоснованные изменения от одной серии к другой. Изменения могут быть вызваны несколькими причинами: изменение состава реактивов, повторная калибровка прибора и даже разные операторы. После исключения отклоняющихся

от нормы данных с помощью теста Граббса рассчитывают стандартное отклонение для построения карт Шухарта. Такое стандартное отклонение сравнивают со стандартным отклонением эталонного метода. Если опубликованный для эталонного метода уровень прецизионности не достигнут, следует выяснить причину.

Следует периодически проверять пределы прецизионности по лаборатории, для чего повторяют указанную процедуру.

После построения на график контроля качества наносят результаты, полученные в каждой серии по контрольному материалу.

Считается, что серия находится вне статистического контроля, если:

I. значение находится вне пределов действия;
II. текущее и предыдущее значения находятся вне пределов внимания, будучи при этом в пределах действия;
III. девять последовательных значений лежат по одну сторону от среднего значения.

Лаборатория должна отреагировать на условия "вне контроля", отклонив результаты для данной серии и проведя испытания для определения причины, а затем приняв меры для исправления ситуации.

Также можно построить контрольную карту Шухарта, на которой будут отражены различия между парами анализов одной и той же пробы, особенно в случае отсутствия эталонного материала. В этом случае строят график абсолютной разности между двумя анализами одной и той же пробы. Нижняя линия графика равна 0, предел внимания - $1.128S_w$, а предел действия - 3,686Sw, где S_w = стандартное отклонение серии.

На графиках этого типа учитывается только повторяемость. Она не должна превышать опубликованный предел повторяемости для этого метода.

При отсутствии контрольного материала периодически возникает необходимость проверить, не превышен ли предел воспроизводимости эталонного метода, для чего полученные результаты сравнивают с результатами из экспериментальной лаборатории, использующей ту же пробу.

Каждая лаборатория проводит два испытания, при этом используется следующая формула:

$$C_r D_{95} (\bar{y}_1 - \bar{y}_2) = \sqrt[2]{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

C_rD_{95}	=	критическая разность (P=0,95)
$\bar{y}_1$	=	среднее значение из 2 результатов лаборатории 1
$\bar{y}_2$	=	среднее значение из 2 результатов лаборатории 2
R	=	воспроизводимость эталонного метода
r	=	повторяемость эталонного метода

Если критическая разность превышена, необходимо выявить причину и повторить тест в течение одного месяца.

2) ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА, УКАЗЫВАЮЩИХ НА ПРЕВЫШЕНИЕ ДОПУСТИМОГО ПРЕДЕЛА

Если результаты анализа указывают на превышение допустимого предела, необходимо выполнить следующую процедуру:

1) В случае с отдельным результатом проводят второе испытание в условиях повторяемости. Если его проведение невозможно, то проводят двойной анализ в условиях повторяемости и используют полученные данные для оценки критической разности.
2) Определяют абсолютное значение разности между средним значением результатов, полученных в условиях повторяемости, и допустимым пределом. Абсолютное значение разности, превышающее критическую разность, указывает на то, что проба не соответствует требованиям.

Критическая разность рассчитывается по формуле:

$$C_r D_{95}(\bar{y} - m_0) = \frac{1}{\sqrt[2]{2}} \sqrt[2]{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

$\bar{y}$ = среднее значение по полученным результатам
m_0 = предел
n = количество анализов
R = воспроизводимость
r = повторяемость

Другими словами, это максимальный предел, при котором среднее значение полученных результатов не должно быть больше:

$$m_0 + C_r D_{95}(\bar{y} - m_0)$$

Если предел минимальный, то среднее значение полученных результатов не должно быть меньше:

$$m_0 - C_r D_{95}(\bar{y} - m_0)$$

3) СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗ ДВУХ ИЛИ БОЛЕЕ ЛАБОРАТОРИЙ И СРАВНЕНИЕ ЭТИХ РЕЗУЛЬТАТОВ С ЭТАЛОННЫМ ЗНАЧЕНИЕМ

Чтобы определить, согласуются ли данные, полученные в двух лабораториях, рассчитывают абсолютную разность между двумя результатами и сравнивают с критической разностью:

$$C_r\ D_{95}\ (\bar{y}_1 - \bar{y}_2) = \sqrt[2]{R^2 - r^2\ (1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2})}$$

$\bar{y}_1$ = среднее значение из 2 результатов лаборатории 1
$\bar{y}_2$ = среднее значение из 2 результатов лаборатории 2
n_1 = количество анализов/проб лаборатории 1
n_2 = количество анализов/проб лаборатории 2
R = воспроизводимость эталонного метода
r = повторяемость эталонного метода

Если результат по двум тестам средний, то уравнение можно упростить до следующего:

$$C_r\ D_{95}\ (\bar{y}_1 - \bar{y}_2) = \sqrt[2]{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

Если данные представляют собой отдельные результаты, то критическая разность равна R.

Если критическая разность не превышена, то делают вывод, что результаты двух лабораторий согласуются между собой.

Сравнение результатов, полученных несколькими лабораториями, с эталонным значением:

Предположим, что p лабораторий провели n1 определений, среднее значение для каждой лаборатории равно y_1, а общее среднее значение равно:

$$\bar{y} = \frac{1}{p} \sum \bar{y}_i$$

Среднее значение всех лабораторий сравнивают с эталонным значением. Если абсолютная разность превышает критическую, рассчитанную по следующей формуле, делают вывод о несоответствии результатов эталонному значению:

$$C_r D_{95} \left(\bar{y}_1 - m_0\right) = \frac{1}{\sqrt[2]{2p}} \sqrt[2]{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{p} \sum \frac{1}{n_1}\right)}$$

C_rD_{95} = критическая разность, рассчитанная согласно п. 2, для эталонного метода.

Эталонное значение может быть, например, значением, присвоенным эталонному материалу, или значением, полученным в той же лаборатории или в другой лаборатории с использованием другого метода.

4) ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НЕВАЛИДИРОВАННЫМИ МЕТОДАМИ

Предварительное значение воспроизводимости по невалидированному методу может быть установлено при сравнении с результатами второй лаборатории:

$$R_{prov} = \sqrt[2]{(\overline{y_1} - \overline{y_2})^2 + \frac{r^2}{2}}$$

$\overline{y}_1$ = среднее значение 2 результатов, полученных в лаборатории 1
$\bar{y}_2$ = среднее значение 2 результатов, полученных в лаборатории 2
r = повторяемость эталонного метода

Предварительную воспроизводимость допустимо использовать для расчета критической разности. Если предварительная воспроизводимость меньше удвоенного значения повторяемости, то ее определяют как 2r.

Значение воспроизводимости, превышающее трехкратную повторяемость или двукратное значение, выведенное через уравнение Горвица, считается неприемлемым.

Уравнение Горвица:

$$RSD_R\,\%_o = 2^{1-0,5log_{10}C}$$

$RSD_R\%$ = стандартное отклонение для воспроизводимости (выражено в процентах от среднего значения)

C = концентрация, выраженная десятичной дробью (например, 10г/100г = 0,1)

Данное уравнение выведено эмпирическим путем на основе более чем 3000 совместных исследований, включающих разнообразную группу анализируемых веществ, матриц и методов измерения. В отсутствие другой информации значения RSD_R, которые ниже или равны значениям RSD_R, рассчитанным по уравнению Горвица, можно считать приемлемыми.

Значения RSD_R, рассчитанные по уравнению Горвица:

Концентрация	RSD_R %
10^{-9}	45
10^{-8}	32
10^{-7}	23
10^{-6}	16
10^{-5}	11
10^{-4}	8
10^{-3}	5,6
10^{-2}	4
10^{-1}	2,8
1	2

Если результат, полученный невалидированным методом, близок к допустимому пределу, решение о пределе принимается следующим образом для верхних пределов:

$$S = m_0 + \{(R_{rout}/R_{ref})-1\}\times C_rD_{95}$$

и для нижних пределов:

$$S = m_0 - \{(R_{rout}/R_{ref})-1\}\times C_rD_{95}$$

S = предел обнаружения
m_0 = допустимый предел
R_{rout} = предварительная воспроизводимость для невалидированного метода
R_{ref} = воспроизводимость для эталонного метода
C_rD_{95} = критическая разница, рассчитанная для эталонного метода, согласно п. 2

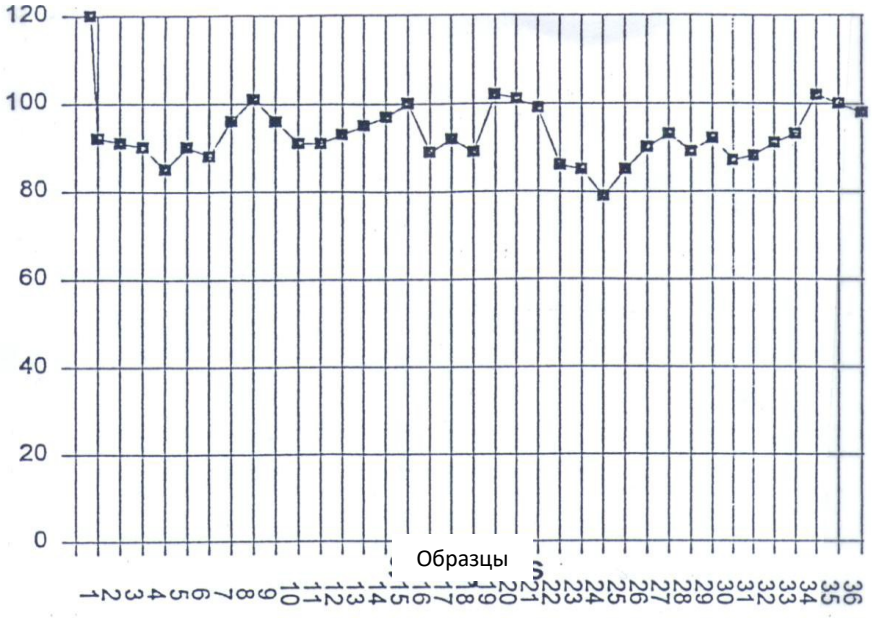
Результат, превышающий предел обнаружения, заменяют на итоговый результат, полученный с помощью эталонного метода.

Критическая разность для уровней вероятности, отличных от 95%
Эту разность можно определить при умножении критической разности уровня 95% на коэффициенты, приведенные в Таблице 1.

Таблица 1 - Мультипликативные коэффициенты
для расчета критической разности
для уровней вероятности, отличных от 95%

Уровень вероятности P	Мультипликативный коэффициент
90	0,82
95	1,00
98	1,16
99	1,29
99,5	1,40

КОНТРОЛЬНАЯ КАРТА ШУХАРТА



БИБЛИОГРАФИЯ

- "Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories". IUPAC. Pure and App. Chem. Vol 67, nº 4, 649-666, 1995
- Стандарт ISO 8258. 1991. "Контрольные карты Шухарта".
- Стандарт ISO 5725, 1994. "Прецизионность методов испытаний - Определение повторяемости и воспроизводимости для стандартного метода испытаний при помощи межлабораторных испытаний".
- "Draft Commission Regulation of establishing rules for the application of reference and routine methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products". Commission of the European Communities, 1995.
- "Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics". IUPAC. Pure an App. Chem., Vol. 62, nº 1,149-162. 1990.

Протокол по разработке, проведению и интерпретации совместных исследований

(Резолюция Oeno
6/2000)

ВВЕДЕНИЕ

После ряда встреч и семинаров группа, в которую вошли представители 27 организаций, утвердила общим согласием "Протокол по разработке, проведению и интерпретации совместных исследований", который был опубликован в журнале Pure & Appl. Chem. 60, 855-864, 1995. Протокол был принят к исполнению рядом организаций. Опираясь на опыт и рекомендации комитета, в ведении которого находится Кодекс методов анализа и отбора проб (совместная программа по пищевым стандартам Продовольственной и сельскохозяйственной организации (ФАО) и ВОЗ, отчет о восемнадцатой сессии, 9 - 13 ноября 1992 года; ФАО, Рим, Италия, ALINORM 93/23, разделы 34-39), было рекомендовано внести три незначительных изменения в первоначальный протокол. К ним относятся: (1) исключить подход с двойным разделением уровней содержанний, поскольку создаваемый им предел взаимодействия зависит от выбора уровней, и если взаимодействие имеет статистическую значимость, то оно не может быть интерпретировано физически; (2) расширить определение "материал"; (3) изменить критерий для удаления выбросов с 1% до 2,5%.

Ниже приводится обновленный протокол с внесенными изменениями. Для удобства чтения также были внесены незначительные редакционные правки. В протокол включены словарь и определения из документа "Номенклатура межлабораторных исследований (Рекомендации 1994)" [опубликовано в журнале Pure Appl Chem., 66, 1903-1911 (1994)], а также по возможности термины, используемые Международной организацией по стандартизации (ISO), но измененные таким образом, чтобы их можно было применять к аналитической химии.

ПРОТОКОЛ

1 Подготовительная работа

Исследования (совместные) эффективности метода требуют значительных усилий и должны проводиться только для методов, которые предварительно прошли надлежащую апробацию.

Внутрилабораторная апробация должна по возможности включать в себя данные по следующим пунктам:

1.1 Предварительная оценка прецизионности

Оценивается общее внутрилабораторное стандартное отклонение результатов анализа в интересующем диапазоне концентраций как минимум на верхней и нижней границах, с особым вниманием к любому стандартному или нормативному значению.

ПРИМЕЧАНИЕ 1: Общее внутрилабораторное стандартное отклонение представляет собой более обширный критерий расхождения, чем стандартное отклонение повторяемости по ISO, см. §3.3 ниже. Подобное стандартное отклонение является наибольшей из внутрилабораторных прецизионных переменных, которые можно ожидать от метода; и включает в себя, по крайней мере, изменчивость между разными днями и преимущественно разными калибровочными кривыми. Оно включает как межпрогонные (межсерийные), так и внутрипрогонные (внутрисерийные) изменения. В этом отношении его можно рассматривать в качестве критерия внутрилабораторной воспроизводимости. Если это значение не находится в приемлемых пределах, не стоит ожидать, что межлабораторное стандартное отклонение (стандартное отклонение воспроизводимости) будет лучше. Этот показатель прецизионности не оценивается по результатам исследования, минимально описанного в данном протоколе.

ПРИМЕЧАНИЕ 2: Общее внутрилабораторное стандартное отклонение можно также оценивать по результатам испытаний на устойчивость, которые показывают, насколько жестко должны контролироваться экспериментальные показатели и каковы их допустимые диапазоны. Определяемые экспериментальным путем диапазоны должны быть включены в описание метода.

1.2 Систематическая ошибка (смещение)

Оценка систематической ошибки результатов анализа в диапазоне концентраций и по исследуемым веществам, как минимум на верхней и нижней границах диапазона концентраций, с особым вниманием к любому стандартному или нормативному значению.

Следует отметить результаты, полученные при применении метода к соответствующим эталонным материалам.

1.3 Извлечение

Извлечение "внутреннего стандарта", добавленного к реальным материалам и к их экстрактам, расщеплениям или другим обработанным растворам.

1.4 Возможность применения

Способность выявлять и измерять с помощью метода физические и химические формы аналита, которые могут присутствовать в материалах, с учетом влияния матрицы.

1.5 Интерференция

Влияние других компонентов, которые, вероятно, присутствуют в заметных концентрациях в исследуемых матрицах и которые могут помешать определению.

1.6 Сопоставление методов

Результаты сопоставления метода с существующими проверенными методами, предназначенными для аналогичных целей.

1.7 Процесс калибровки

Установленные процедуры по калибровке и холостым поправкам не должны вызывать существенного смещения результатов.

1.8 Описание метода

Метод должен быть записан в четкой и понятной форме.

1.9 Значащие цифры

Лаборатория-инициатор должна указать, какое количество значащих цифр следует сообщить, основываясь на данных измерительного прибора.

ПРИМЕЧАНИЕ: При статистических расчетах на основе представленных данных следует использовать все возможности калькулятора или компьютера без округления или усечения до получения окончательных средних и стандартных отклонений. На этом этапе стандартные отклонения округляются до двух значащих цифр, а средние значения и соответствующие стандартные отклонения округляются до значащих цифр стандартного отклонения. Например, если $S_R = 0,012$, то *c* указывается как 0,147, а не как 0, 1473 или 0,15, а RSD_R указывается как 8,2% (символы даны в Приложении L). Если расчеты стандартного отклонения должны проводиться вручную поэтапно с переносом

промежуточных результатов, количество значащих цифр, сохраняемых для квадратных чисел, должно быть как минимум в два раза больше количества цифр в данных плюс 1.

2. Подход для исследования эффективности метода

2.1 Количество материалов

Для одного типа вещества используют не менее 5 материалов (проб для испытаний); и только в том случае, если один уровень спецификации определен для одной матрицы, минимально необходимое число материалов может быть сокращено до 3. Для данного параметра подхода две части разделенного уровня и две отдельные части слепых реплик для каждой лаборатории рассматриваются как один материал.

ПРИМЕЧАНИЕ 1: Материал - это комбинация "аналит / матрица / концентрация", к которой применяются параметры эффективности метода. Данный параметр определяет, насколько применим тот или иной метод. Применяя метод к какому либо числу различных веществ, следует выбрать достаточное количество матриц и уровней, чтобы учесть и потенциальные интеррференции, и концентрации при типичном использовании.

ПРИМЕЧАНИЕ 2: 2 или более испытуемых проб слепых или открытых реплик статистически представляют собой единый материал (не являются независимыми).

ПРИМЕЧАНИЕ 3: Один разделенный уровень (пара Юдена), статистически проанализированный как пара, представляет собой один материал; и представляет собой 2 материала, если пара была статистически проанализирована и представлена как отдельные испытуемые пробы. Кроме того, пара может быть использована для расчета внутрилабораторного стандартного отклонения, s_r как:

$s_r = \sqrt{(\sum d_i^{\,2}) / 2n}$ (для двойных, слепых или открытых испытаний),

$s_r = \sqrt{(\sum (d_i^{\,2}) / 2(n - 1)}$ (для пар Юдена),

где d_i - разность между двумя отдельными значениями разделенного уровня по каждой лаборатории, а n - количество лабораторий. В данном случае S_R (стандартное отклонение среди лабораторий) является лишь средним значением для двух значений S_R, вычисленных из отдельных компонентов разделенного уровня, и используется лишь для проверки вычислений.

ПРИМЕЧАНИЕ 4: В зависимости от цели анализа холостой или отрицательный контроль может и выступать, и не выступать в качестве материала. Например, при следовом анализе, где, как правило, ищут очень низкие уровни (около предела количественного определения), холостые пробы считаются материалами, они необходимы для определения "пределов измерения". Однако если холостая проба является лишь процедурным контролем в макроанализе (например, жир в сыре), она не будет считаться материалом.

2.2 Количество лабораторий

Результаты по каждому материалу должны представить не менее 8 лабораторий; и только в случае, если такое количество участников невозможно (например, требуется очень дорогое оборудование или специализированные лаборатории), исследование может проводиться с меньшим количеством лабораторий, но никак не менее 5. Если исследование проводится в целях международного использования, в нем должны участвовать лаборатории из разных стран. Если методы требуют применения специализированных приборов, то к исследованию допустимо привлечь все доступные лаборатории. В таких случаях в знаменателе для расчета стандартного отклонения вместо "(n - 1)" указывают "n". Последующие участники исследования должны продемонстрировать способность работать на таком же высоком уровне, что и первоначальные участники.

2.3 Количество реплик

Параметры прецизионности повторяемости оцениваются по одной из следующих комбинаций (перечислены в порядке примерного предпочтения):

2.3.1 Разделенный уровень

Для каждого уровня, который разделен и представляет собой один материал для целей дизайна и статистического анализа, используют 2 почти идентичные испытуемые пробы, которые незначительно отличаются по концентрации аналита (например, <1-5%). Каждая лаборатория должна проанализировать каждую испытуемую пробу один и только один раз.

ПРИМЕЧАНИЕ: Статистический критерий, которой необходимо исполнить, чтобы пара испытуемых проб могла считаться разделенным уровнем, заключается в том, что стандартное отклонение

воспроизводимости двух частей одного разделенного уровня должно быть одинаковым.

2.3.2 Сочетание слепых реплик и разделенных уровней
В одном и том же исследовании для некоторых материалов используют разделенные уровни, а для других материалов - слепые реплики (единичные значения от каждой представленной испытуемой пробы).

2.3.3 Слепые реплики
Для каждого материала используют слепые идентичные реплики; когда невозможно осуществить цензурирование данных (например, автоматический ввод, расчет и распечатка), допускается использование не слепых идентичных реплик.

2.3.4 Известные реплики
Для каждого материала используют известные реплики (2 или более анализов испытуемых порций из одной и той же пробы), но только в том случае, если использование одного из предыдущих вариантов нецелесообразно.

2.3.5 Независимые анализы
При исследовании используют только одну испытуемую порцию каждого материала (т.е. не проводят несколько анализов), но исправляют невозможность расчета параметров воспроизводимости с помощью параметров контроля качества или других внутрилабораторных данных, полученных независимо от исследования эффективности метода.

3. Статистический анализ (см. диаграмму, A.4.1)
Для статистического анализа данных необходимо выполнить перечисленные ниже статистические операции и предоставить результаты. Не исключается проведение дополнительных, вспомогательных операций.

3.1 Достоверные данные
Представляют и статистически обрабатывают только достоверные данные. Достоверные данные - это данные, которые могут быть представлены в результате нормального выполнения лабораторных анализов; они не искажены из-за отклонения от метода, неисправности приборов, неожиданных явлений в ходе анализа, а также канцелярских, типографских и арифметических ошибок.

3.2 Односторонний дисперсионный анализ
Чтобы оценить компоненты дисперсии и параметры повторяемости и воспроизводимости, отдельно для каждого материала (испытуемой пробы) применяют односторонний дисперсионный анализ и обработку выбросов.

3.3 Первичная оценка
Рассчитывают среднее значение, *c* (= среднее значение лабораторных средних значений), относительное стандартное отклонение повторяемости, RSD_r, и относительное стандартное отклонение воспроизводимости, RSD_R без удаления выбросов, но на основе только достоверных данных.

3.4 Выбросы
Расчетные параметры прецизионности, которые также должны быть представлены, опираются на первоначальные достоверные данные, очищенные от всех выбросов, отмеченных при гармонизированной процедуре удаления выбросов за 1994 год. Данная процедура состоит в последовательном применении критерия Кохрана и теста Граббса (при 2,5% уровне вероятности (P), односторонний для Кохрана и двусторонний для Граббса) до тех пор, пока не будет выявлено больше ни одно отклонение или пока первоначальное число лабораторий, предоставивших достоверные данные, не снизится на 22,2% (= 219).

ПРИМЕЧАНИЕ: Исправить ошибки или обнаружить причины, которые приводят к возникновению недостоверных данных, 3.1, можно при оперативной консультации с лабораторией, сообщившей подозрительные значения. Гораздо предпочтительнее признать ошибки и недостоверные данные, чем полагаться на статистические исследования, чтобы удалить отклоняющиеся значения.

3.4.1 Критерий Кохрана
Сначала выбросы выявляют по критерию Кохрана (односторонний тест при P = 2,5%) и исключают все лаборатории, критическое значение которых превышает значение, указанное в таблице (Приложение A.3. 1) для количества лабораторий и реплик.

3.4.2 Тест Граббса
Для одиночных значений проводят тесты Граббса (двусторонние) и отбрасывают все отклоняющиеся лаборатории. Если ни одна

лаборатория не отмечена, то тесты (двусторонние) проводят для парных значений - 2 на одной стороне и по 1 значению на каждой стороне, P = 2,5% в целом. Исключают любую лабораторию (лаборатории), отмеченную этими тестами, если ее критическое значение превышает значение, приведенное в соответствующем столбце таблицы (Приложение A.3.3). Лаборатории прекращают отбрасывать, когда при следующем тестировании отклонения будут отмечены у более чем 22,2% (2 из 9) лабораторий.

ПРИМЕЧАНИЕ: Тесты Граббса применяются к одному материалу за раз в серии реплицированных средних показателей из всех лабораторий, а не к отдельным значениям реплицированных проб, поскольку распределение всех взятых вместе значений является мультимодальным, а не гауссовским, т.е. их отличия от общего среднего для данного материала не являются независимыми.

3.4.3 Завершающая оценка
Параметры пересчитывают согласно п. 3.3 после исключения лабораторий, отмеченных при предыдущей процедуре. Если при выполнении последовательности Кохрана-Граббса не было удалено ни одного выброса, тестирование завершают. В противном случае, повторно применяют последовательность Кохрана-Граббса к данным, очищенным от отмеченных выбросов, до тех пор, пока не будут отмечены новые выбросы или пока в следующем цикле не будет удалено более 22,2% (2 из 9 лабораторий). См. диаграмму A.3.4.

4. Итоговый отчет
Необходимо опубликовать итоговый отчет и включить в него все достоверные данные. Другие сведения и параметры должны быть по возможности представлены в формате (по сообщаемым пунктам), аналогичному тому, что указано ниже:
Испытания эффективности метода [x], проведенные на международном уровне в [год(ы)] [организацией], в которых участвовали [y и z] лаборатории, каждая из которых выполнила [k] повторов, дали следующие статистические результаты:

ТАБЛИЦА ПАРАМЕТРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ
Аналит; результаты выражены в [единицы]
Материал [описание и перечисление в столбцах в верхней части таблицы в порядке возрастания величины средств]

Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов
Количество исключенных лабораторий
Код (или обозначение) исключенных лабораторий
Количество принятых результатов
Среднее значение
Истинное или принятое значение, если таковое известно
Стандартное отклонение воспроизводимости (S_r)
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости (RSD_R)
Предел воспроизводимости, r (2,8 x S_r)
Стандартное отклонение воспроизводимости (S_R)
Относительно стандартное отклонение воспроизводимости (RSD_R)
Предел воспроизводимости, R (2,8 x S_R)

4.1 Символы
Перечень символов для использования в отчетах и публикациях приведен в Приложении 1(A.1.).

4.2 Определения
Перечень определений для использования в отчетах и публикациях приведен в Приложении 2 (A.2.).

4.3 Разное

4.3.1 Извлечение / восстановление
Извлечение добавленного аналита в качестве контроля погрешности метода или лаборатории должно быть рассчитано следующим образом:
[Маргинальное] извлечение, %=
(Общий обнаруженный аналит – изначально присутствовавший аналит) x 100/(добавленный аналит)

Хотя аналит может быть выражен в виде концентрации или количества, единицы измерения должны быть одинаковыми во всех случаях. Если количество аналита определяется путем анализа, оно должно быть определено одинаково во всех случаях.
Результаты анализа должны быть представлены без поправки на извлечение. О результатах извлечения следует сообщать отдельно.

4.3.2 Когда S_r отрицательное
При исследовании эффективности метода по определению S_R больше или равно S_r; иногда оценка S_r выше оценки S_R (среднее по репликам больше, чем диапазон лабораторных средних значений и рассчитанное S_L^2 тогда

отрицательное). Когда подобное происходит, устанавливают, что $S_L = 0$ и $S_r = S_l$.

5. ИСТОЧНИКИ

Horwitz, W. (1988) Protocol for the design, conduct, and interpretation of method performance studies. Pure & Appl. Chem. 60, 855-864.

Pocklington, W.D. (1990) Harmonized protocol for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics. Pure and Appl. Chem. 62, 149-162.

International Organization for Standardization. International Standard 5725-1986. Under revision in 6 parts; individual parts may be available from National Standards member bodies.

А. ПРИЛОЖЕНИЯ
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. - СИМВОЛЫ

Для обозначения параметров, выявленных в ходе исследования эффективности метода, используют следующий набор символов и терминов.

Среднее значение (среднее по лабораториям)	x
Стандартные отклонения:	s (оценки)
Повторяемость	S_r
Чистое межлабораторное	S_L
Воспроизводимость	S_R
Дисперсии: $S_R^2 = S_L^2 + S_r^2$	S^2 (с нижним индексом r, L и R)
Относительные стандартные отклонения:	RSD (с нижним индексом r, L и r)
Максимально допустимая разность (согласно ISO 5725-1986); См. A.2.4. и A.2.5.	
Предел повторяемости	$r = (2,8 \times S_r)$
Предел воспроизводимости	$R = (2,8 \times S_R)$
Число реплик на лабораторию	k (общее)
Среднее число реплик на лабораторию i	k (для сбалансированного плана)
Число лабораторий	L
Число материалов (испытуемых проб)	m

Общее число значений в конкретном анализе n (= kL для сбалансир. плана)
Общее число значений в конкретном исследовании N (= kLm для сбаланс. плана)

Если используются другие символы, необходимо полностью объяснить, как они соотносятся с рекомендуемыми символами.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. - ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Используют следующие определения. Первые три определения опираются на документ Международного союза теоретической и прикладной химии ("IUPAC") под названием "Номенклатура межлабораторных исследований" (утверждено для публикации в 1994 г.). Следующие два определения выведены из данных из ISO3534-1:1993. Предполагается, что все результаты испытаний являются независимыми, т.е. "полученными способом, на который не влияет ни один предыдущий результат для того же или подобного испытуемого объекта". Количественные показатели прецизионности зависят в значительной степени от оговоренных условий. Условия повторяемости и воспроизводимости - это особые наборы экстремальных оговоренных условий".

A.2.1 Исследования эффективности метода
Межлабораторное исследование, при котором все лаборатории следуют одному и тому же письменному протоколу и используют один и тот же тестовый метод для замера величин у ряда идентичных испытуемых объектов [испытуемые пробы, материалы]. Представленные результаты используются для оценки рабочих характеристик метода. Обычно эти характеристики включают внутрилабораторную и межлабораторную прецизионность, а также, по необходимости и возможности, другие характеристики, такие как систематическая ошибка, извлечение, параметры внутреннего контроля качества, чувствительность, предел определения и применимость.

A.2.2. Лабораторное исследование характеристик
Межлабораторное исследование, в ходе которого группа лабораторий проводит один или несколько анализов или измерений одного или нескольких однородных, стабильных испытуемых объектов по методу, который выбрала или использует каждая из лабораторией. Представленные результаты сравнивают с результатами других лабораторий или с известным или установленным эталонным значением, обычно с целью оценки или улучшения работы лаборатории.

A.2.3 Сертификационное исследование материала
Межлабораторное исследование, которое присваивает эталонное значение ("истинное значение") величине (концентрации или свойству) у испытуемого объекта, обычно с известной неопределенностью.

A.2.4 Предел повторяемости (r)
Если среднее по значениям, полученным в результате двух единичных определений одним и тем же методом на идентичных испытуемых объектах в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в течение коротких промежутков времени, находится в диапазоне средних значений, приведенных в заключительном отчете, 4.0, абсолютная разность между двумя полученными результатами испытаний должна быть меньше или равна пределу повторяемости (r) [= 2,8 x s,), который обычно может быть выведен путем линейной интерполяции s_r из отчета.

ПРИМЕЧАНИЕ: Данное определение и определение для предела воспроизводимости выведены из пяти терминов, вытекающих один из другого, и расширены с тем, чтобы их можно было применять путем интерполяции к испытуемому объекту, среднее значение которого не совпадает с тем, которое использовалось для установления исходных параметров, что является обычным случаем при применении этих определений. Термин "предел повторяемости [и воспроизводимости]" применяется конкретно к вероятности 95% и принимается равным 2,8 x s_r [или S_R]. "Критическая разность повторяемости [и воспроизводимости]" – это общий термин для данного статистического понятия, применяемый к любому параметру сдвига (например, медиана) и с другой вероятностью (например, 99%).

A.2.5 Предел воспроизводимости (R)
Если среднее по значениям, полученным в результате двух единичных определений одним и тем же методом на идентичных испытуемых объектах в разных лабораториях с разными операторами, использующими разное оборудование, находится в диапазоне средних значений, приведенных в итоговом отчете, 4.0, абсолютная разность между двумя полученными результатами испытаний должна быть меньше или равна пределу воспроизводимости (R) [= 2,8 x s_R], который обычно может быть выведен путем линейной интерполяции S_R из отчета.

ПРИМЕЧАНИЕ 1: Если результаты межлабораторного испытания позволяют, то значение r и R может быть указано как относительное значение (например, в процентах от определенного среднего значения) в качестве альтернативы абсолютному значению.

ПРИМЕЧАНИЕ 2: Если заключительный результат исследования представляет собой среднее значение, полученное из более чем одного значения, т.е. k больше 1, то перед использованием R для сравнения результатов обычного анализа между двумя лабораториями значение R должно быть скорректировано по следующей формуле.

$$R' = \{R^2 + r^2 (1 - [1/k]\}^{1/2}$$

Аналогичные корректировки должны быть сделаны для повторных результатов, составляющих окончательные значения для S_R и RSD_R, если эти параметры будут использоваться для контроля качества.

ПРИМЕЧАНИЕ 3: Предел воспроизводимости, r, можно трактовать как величину, в пределах которой два определения должны совпадать друг с другом в лаборатории в 95% случаев. Предел воспроизводимости, R, можно трактовать как величину, в пределах которой два отдельных определения, проведенные в разных лабораториях, должны совпадать друг с другом в 95% случаев.

ПРИМЕЧАНИЕ 4: Оценки S_R могут быть получены только в результате запланированного, организованного исследования эффективности метода; оценки S_r могут быть получены в результате обычной работы в лаборатории с использованием контрольных карт. Для нерегулярных анализов при отсутствии контрольных карт точность внутри лаборатории может быть приблизительно равна половине S_R (Pure and Appl. Chem., 62, 149-162 (1990), раздел L3, примечание).

A.2.6 Односторонний дисперсионный анализ

Односторонний дисперсионный анализ - статистическая процедура, проводимая с целью получить оценки для внутрилабораторной и межлабораторной изменчивости на основе каждого материала. Примеры расчетов для одноуровневых планов и для единожды разделенных одноуровневых планов можно найти в ISO 5725-1986.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. – КРИТИЧЕСКИЕ ЗНАЧЕНИЯ

A.3.1. Критические значения для коэффициента максимальной дисперсии Кохрана при 2,5% (одностороннем) уровне отклонения, выраженные в виде процента наибольшей дисперсии от общей дисперсии; r = число реплик.

Число лаб.	**r=2**	**r = 3**	**r=4**	**r = 5**	**r = 6**
4	94.3	81.0	72.5	65.4	62.5
5	88.6	72.6	64.6	58.1	53.9
6	83.2	65.8	58.3	52.2	47.3
7	78.2	60.2	52.2	47.3	42.3
8	73.6	55.6	47.4	43.0	38.5
9	69.3	51.8	43.3	39.3	35.3
10	65.5	48.6	39.9	36.2	32.6
11	62.2	45.8	37.2	33.6	30.3
12	59.2	43.1	35.0	31.3	28.3
13	56.4	40.5	33.2	29.2	26.5
14	53.8	38.3	31.5	27.3	25.0
15	51.5	36.4	29.9	25.7	23.7
16	49.5	34.7	28.4	24.4	22.0
17	47.8	33.2	27.1	23.3	21.2
18	46.0	31.8	25.9	22.4	20.4
19	44.3	30.5	24.8	21.5	19.5
20	42.8	29.3	23.8	20.7	18.7
21	41.5	28.2	22.9	19.9	18.0
22	40.3	27.2	22.0	19.2	17.3
23	39.1	26.3	21.2	18.5	16.6
24	37.9	25.5	20.5	17.8	16.0
25	36.7	24.8	19.9	17.2	15.5
26	35.5	24.1	19.3	16.6	15.0
27	34.5	23.4	18.7	16.1	14.5
28	33.7	22.7	18.1	15.7	14.1
29	33.1	22.1	17.5	15.3	13.7
30	32.5	21.6	16.9	14.9	13.3
35	29.3	19.5	15.3	12.9	11.6
40	26.0	17.0	13.5	11.6	10.2
50	21.6	14.3	11.4	9.7	8.6

Таблицы A.3.1 и A.3.3 были рассчитаны Р. Альбертом (в октябре 1993 года) путем компьютерного моделирования, включающего несколько прогонов примерно по 7000 циклов для каждого значения, а затем сглажены. Хотя таблица A.3.1 применима только к сбалансированному дизайну (одинаковое количество реплик из всех лабораторий), ее

допустимо применять для несбалансированного дизайна без слишком большой ошибки, если имеется только несколько отклонений.

A.3.2 Расчет максимального дисперсионного коэффициента Кохрана для выбросов. Внутрилабораторную дисперсию по каждой лаборатории вводят в компьютер, делят наибольшую из них на сумму всех дисперсий и умножают на 100. Полученный коэффициент является статистикой Кохрана, которая указывает на наличие удаляемого выброса, если этот коэффициент превышает критическое значение, указанное выше в таблице Кохрана для указанного числа реплик и лабораторий.

A.3.3 Критические значения для тестов Граббса на экстремальные отклонения при 2,5% (двустороннем) уровне отклонения и 1,25% (одностороннем), выраженные как процентное уменьшение стандартных отклонений при удалении подозрительного значения (значений).

Число лаб.	Один наибольш. и наименьш.	Два наибольш. и наименьш.	Один наибольш. и один наименьш.
4	86.1	98.9	99.1
5	73.5	90.9	92.7
6	64.0	81.3	84.0
7	57.0	73.1	76.2
8	51.4	66.5	69.6
9	46.8	61.0	64.1
1	42.8	56.4	59.5
1	39.3	52.5	55.5
1	36.3	49.1	52.1
1	33.8	46.1	49.1
1	31.7	43.5	46.5
1	29.9	41.2	44.1
1	28.3	39.2	42.0
1	26.9	37.4	40.1
1	25.7	35.9	38.4
1	24.6	34.5	36.9
2	23.6	33.2	35.4
2	22.7	31.9	34.0
2	21.9	30.7	32.8
2	21.2	29.7	31.8
2	20.5	28.8	30.8
2	19.8	28.0	29.8
2	19.1	27.1	28.9
2	18.4	26.2	28.1
2	17.8	25.4	27.3
2	17.4	24.7	26.6

3	17.1	24.1	26.0
4	13.3	19.1	20.5
5	11.1	16.2	17.3

A.3.4 Расчет значений для теста Граббса

Чтобы рассчитать единую статистику для теста Граббса, вычисляют среднее значение для каждой лаборатории, а затем рассчитывают стандартное отклонение (M) этих средних значений L (обозначают как исходное s). Вычисляют SD по группе средних показателей с наибольшим удаленным средним показателем (SH); вычисляют SD по группе средних с наименьшим удаленным средним (SL). Процентное уменьшение SD для обеих групп вычисляют следующим образом:

100 x [1 - (sL/s] и 100 x [1 - (sH/s)].

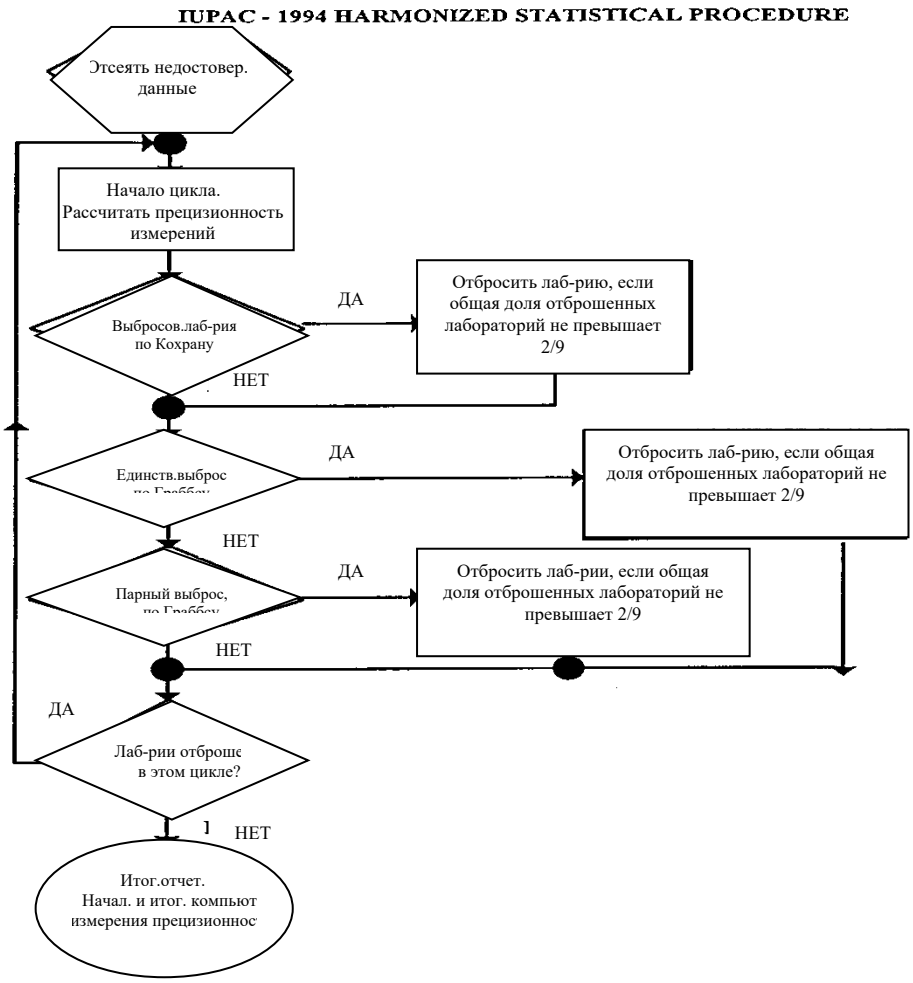
Наибольшее из этих двух процентных уменьшений считается единичной статистикой для теста Граббса, которая сигнализирует о наличии выброса, подлежащего исключению на уровне P = 2,5% (двухсторонний), если он превышает критическое значение из столбца с единичными значениями (столбец 2 таблицы A.3.3) для количества лабораторных средних показателей, использованных для расчета исходного s.

Для расчета парной статистики для теста Граббса высчитывают процентное уменьшение стандартного отклонения при отбрасывании двух самых высоких средних, а также при отбрасывании двух самых низких средних, как указано выше. Наибольшее из процентных изменений стандартного отклонения сравнивают с табличными значениями из столбца 3 и выполняют действия (1) или (2): (1) если табличное значение превышено, удаляют ответственную пару. Снова повторяют цикл, начиная с критерия Кохрена на экстремальное отклонение, далее тест Граббса на экстремальное значение и парный тест Граббса на экстремальное значение; (2) если больше никаких значений не отбрасывают, то рассчитывают процентное изменение стандартного отклонения, полученное при отбрасывании как самого высокого экстремального значения, так и самого низкого, и сравнивают с табличными значениями из последнего столбца таблицы A.3.3. Если табличное значение превышено, удаляют пару крайних средних значений и снова начинают цикл с критерия Кохрена, пока не будут отброшены все значения. В любом случае тестирование выбросов прекращают после удаления более 22,2% (2/9) средних значений.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

А.4.1. Блок-схема для отбрасывания выброса

Гармонизированная статистическая процедура (Международный союз теоретической и прикладной химии (IUPAC), 1994 г.)



Оценка пределов обнаружения и количественного определения для аналитического метода

(Резолюция Oeno 7/2000)

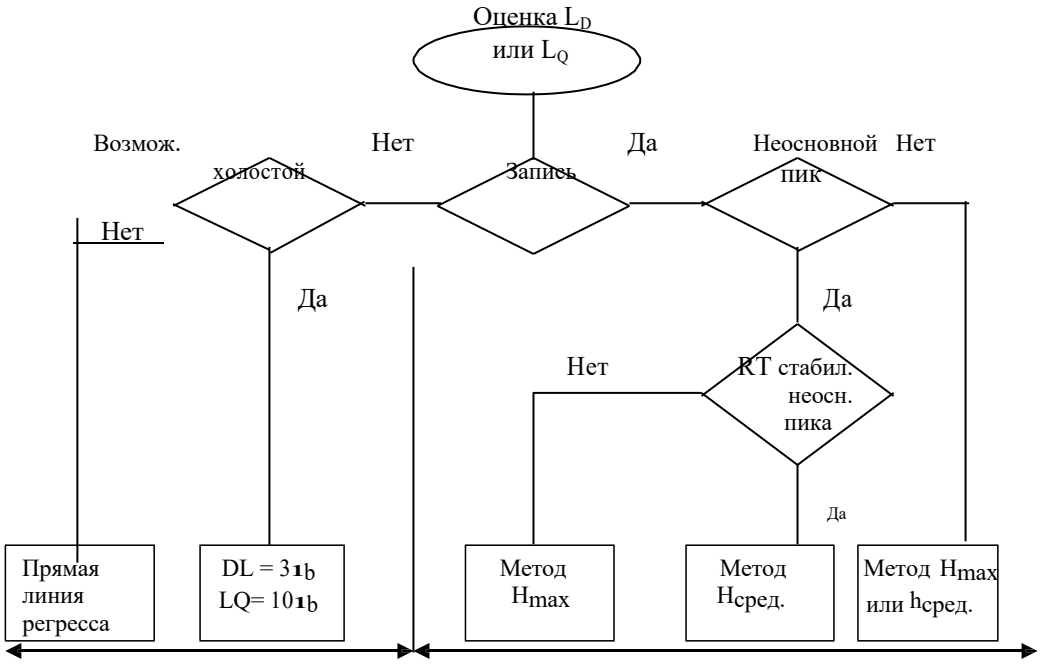
1 - Цель: установить для метода пределы обнаружения и количественного определения.

ПРИМЕЧАНИЕ: Предлагаемая процедура расчета устанавливает значения "предела обнаружения и количественного определения" с учетом аппаратного отклика. При итоговом расчете этих значений для данного метода необходимо учитывать факторы, возникающие при подготовке пробы.

2 - Определения

- Предел обнаружения: наименьшая концентрация или доля анализируемого вещества, которая может быть обнаружена с приемлемым уровнем неопределенности, но не определена количественно при экспериментальных условиях, описанных в методе.
- Предел количественного определения: наименьшая концентрация или доля анализируемого вещества, которая может быть определена количественно с приемлемым уровнем неопределенности при экспериментальных условиях, описанных в методе.

3 – Блок-схема для принятия решения



4 - Методология

4.1 Подход на основе результатов

Если аналитический метод не выдает документированный график, а только числовые значения (т.е. колориметрия), предел обнаружения (L_D) и предел количественного определения (L_Q) оцениваются одним из двух следующих методов.

4.1.1 - Метод 1:

Производят прямое считывание результатов n измерений (количество аналита или отклик) по отдельным аналитическим "холостым" пробам, содержащим все компоненты, за исключением вещества, на которое проводится тестирование.

$$L_D = m_{холостой} + 3S_{холостой} \text{ и}$$
$$L_Q = m_{холостой} + 10S_{холостой}$$

где $m_{холостой}$ и $S_{холостой}$ являются средним и стандартным отклонением для n измерений.

Примечание: Коэффициент умножения 3 указывает на 0,13% вероятность того, что можно сделать вывод о наличии искомого вещества, хотя на самом деле оно отсутствует. 10 соответствует 0,5% вероятности.

4.1.2 - Метод 2:

Использование калибровочной прямой: $Y = a + bX$

Предел обнаружения - это наименьшая концентрация вещества, которую можно отличить от холостой пробы с 0,13% риском удержать пробы, не содержащие ничего; другими словами, начало значения, при котором статистический тест, сравнивающий отклик с 0, становится значимым с уровнем ошибки α 0,13%. Отсюда:

$$Y_{DL} = a + 3S_a$$
$$X_{DL} = (a + 3S_a)/b$$

Где S_a - стандартное отклонение на ординате в начале прямой регрессии. Логика такая же для L_Q, где коэффициент умножения равен 10 (0,5% риск).

4.2 - Подход на основе графиков

Для аналитических методов, которые позволяют выстраивать графики (например, хроматография), предел обнаружения оценивается на основе фонового шума аналитической холостой записи по данной пробе.

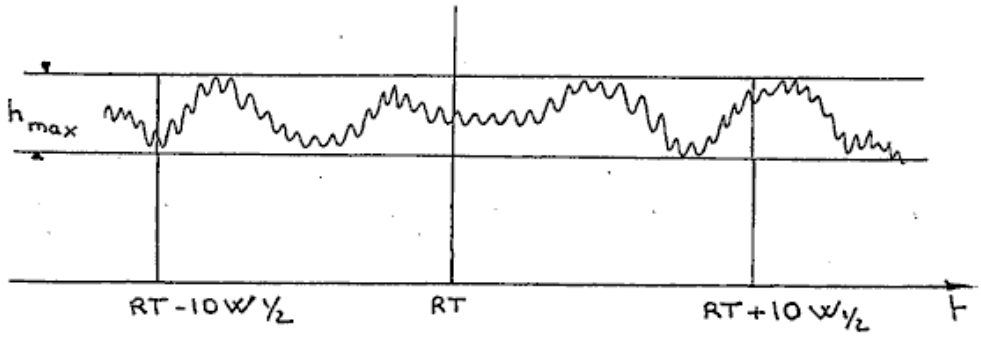
$L_D = 3 \times h \times R$ (сопутствующий риск ниже 0,13%) и

L_Q = 10 x h x R (сопутствующий риск ниже 0,5%), где

- h - средняя или максимальная амплитуда интервала сигнала, соответствующего 10 ширинам s средневысотного пика по обе стороны от времени удерживания, в зависимости от стабильности.
- R - коэффициент отклика количества/сигнала, выраженный как функция от количества вещества/высоты.

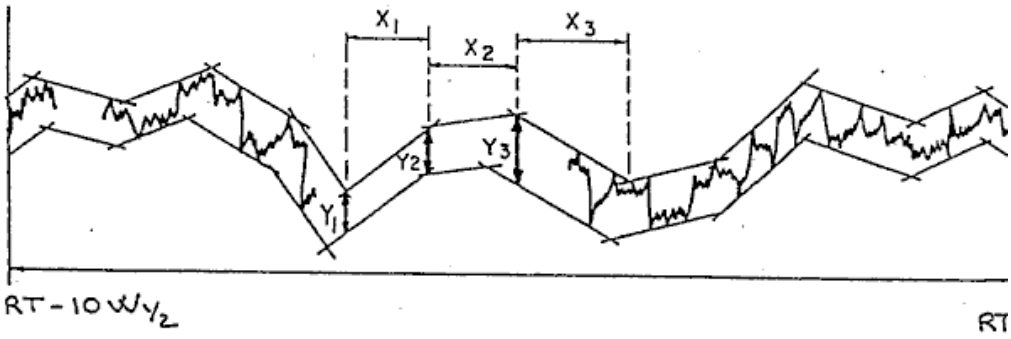
В каждом случае на холостых пробах проводят три серии по три ввода с интервалом в несколько дней.

4.2.1 Метод h_{max}



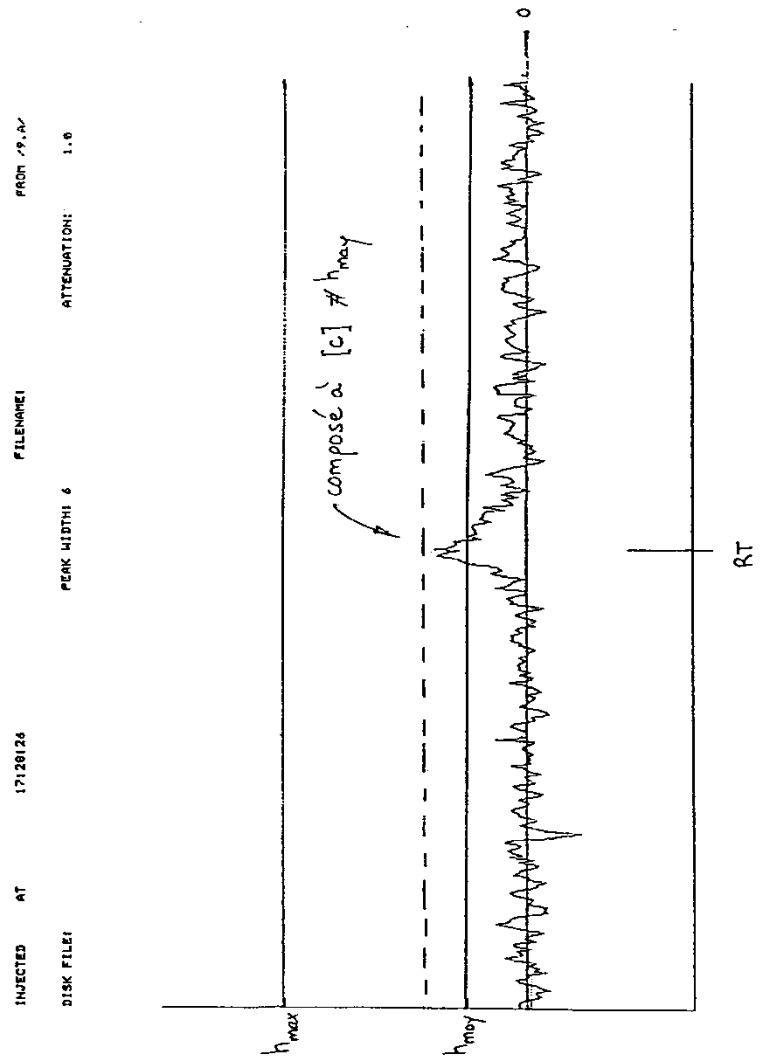
- Увеличивают уровень фонового шума до максимума (рис. 1 выше);
- центрируют вокруг времени удерживания (RT) продукта;
- рисуют интервал из 10 ширин пика средней высоты (W1/2) по обе стороны от RT;
- проводят две параллельные линии, одна из которых проходит через самую высокую точку самого высокого пика, а другая - через основание самой глубокой точки;
- оценивают высоту -> h_{max};
- вычисляют коэффициент реакции (R-фактор);
- L_{Dmax} = 3 x h_{max} x R
- L_{Qmax} = 10 x h_{max} x R

4.2.2 Метод $h_{средний}$



- Увеличивают уровень фонового шума до максимума (рис. 2 выше);
- центрируют вокруг времени удерживания (RT) продукта;
- рисуют интервал окно из 10 ширин пика средней высоты (W1/2) по обе стороны от RT;
- разделяют на 20 равных участков (x);
- проводят две параллельные линии в каждом блоке, одна проходит через самую высокую точку самого высокого пика, другая - через основание самой глубокой точки;
- измеряют высоты, y;
- вычисляют среднее значение ($y = h_{среднее}$);
- вычисляют коэффициент реакции (коэффициент R);
- $LD_{среднее} = 3 \times h_{среднее} \times R$;
- $LQ_{average} = 10 \times h_{среднее} \times R$

Данные оценки могут сами себя подтвердить при введении растворенного вещества в количествах, близких к рассчитанным пределам (рис. 3 и 4).

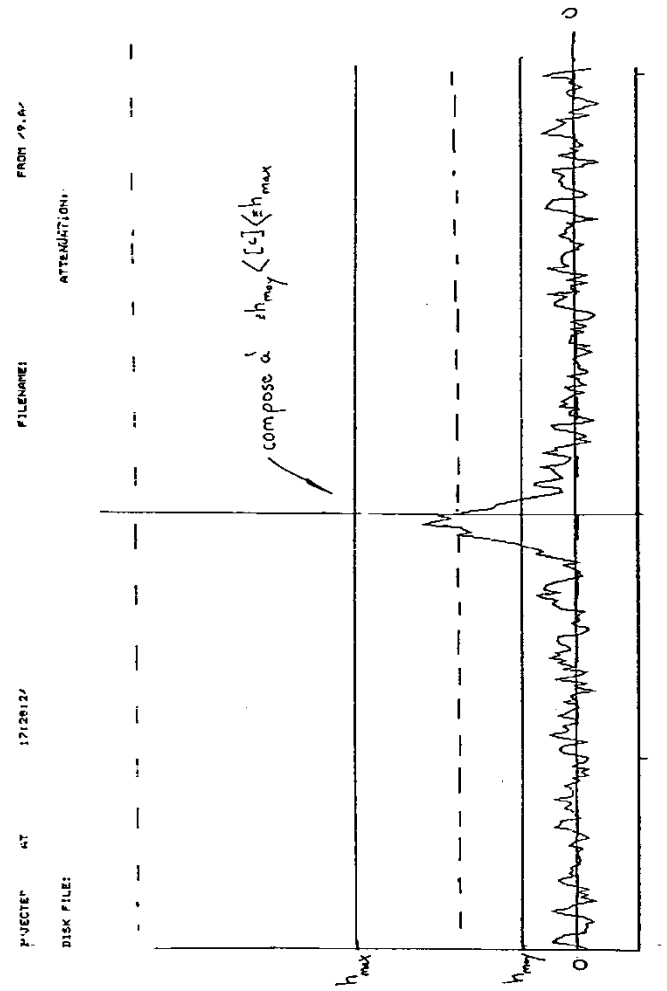


Состав при [c] # h_{max}

Рисунок 3: Проверка расчетов пределов.

Концентрация состава приближается к $H_{среднее}$

ПРИМЕЧАНИЕ: Пунктирная линия соответствует реальному введенному объему, но поскольку эта цифра приведена в качестве примера, ее можно удалить из окончательного текста.



Состав при $h_{среднее} < [c] < \approx h_{max}$

Рисунок 4: Проверка расчетов пределов.
Концентрация состава между $H_{среднее}$ и H_{max}

ПРИМЕЧАНИЕ: Пунктирная линия соответствует реальному введенному объему, но поскольку эта цифра приведена в качестве примера, ее можно удалить из окончательного текста.

Гармонизированное руководство по внутреннему контролю качества в аналитических химических лабораториях

(Резолюция Oeno 19/2002)

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ
- **1.1 Основные понятия**
- **1.2. Область применения документа**
- **1.3. Внутренний контроль качества и неопределенность**

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ
- **2.1. Международные определения**
- **2.2. Определения терминов, характерных для данного документа**

3. ПРАКТИКА ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА И ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА
- **3.1 Обеспечение качества**
- **3.2 Выбор аналитического метода**
- **3.3. Внутренний контроль качества и аттестационные испытания**

4. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА
- **4.1. Введение**
- **4.2. Общий подход - статистический контроль**
- **4.3. Внутренний контроль качества и соответствие цели**
- **4.4. Природа ошибок**

5. ВКК И ПРЕЦИЗИОННОСТЬ В ПРЕДЕЛАХ ПРОГОНА
- **5.1. Прецизионность и дублирование**
- **5.2. Интерпретация повтора данных**

6. КОНТРОЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ВКК
- **6.1. Введение**
- **6.2. Роль сертифицированных эталонных материалов**
- **6.3. Подготовка контрольных материалов**
- **6.4. Холостые определения**

6.5. Прослеживаемость при проверках с вводом и с извлечением внутреннего стандарта

7. РЕКОМЕНДАЦИИ

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

9. ИСТОЧНИКИ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. КОНТРОЛЬНЫЕ КАРТЫ ШУХАРТА

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Основные понятия

В настоящем документе изложены основные принципы выполнения аналитическими лабораториями внутреннего контроля качества (ВКК). ВКК - одна из ряда совместно осуществляемых мер, которую химики-аналитики могут предпринять, чтобы обеспечить соответствие полученных в лаборатории данных намеченным целям. На практике соответствие целям определяется путем сравнения точности, достигнутой в лаборатории в определенное время, с требуемым уровнем точности. Таким образом, внутренний контроль качества включает в себя стандартные практические процедуры, которые позволяют химику-аналитику либо принять результат или группу результатов, поскольку они соответствуют целям, либо отклонить и повторить анализ. По сути, ВКК является важным фактором, определяющим качество аналитических данных, и признается в качестве такового аккредитационными агентствами.

Внутренний контроль качества осуществляется путем использования при проведении анализа определенных эталонных материалов, называемых в настоящем документе "контрольными материалами", а также путем проведения дублирующего анализа. Контрольные материалы должны быть, по возможности, репрезентативными по отношению к рассматриваемым испытуемым материалам, это касается состава матрицы, состояния физической подготовки и диапазона концентрации аналита. Поскольку контрольные материалы обрабатываются точно так же, как и испытуемые, они рассматриваются как суррогаты, которые могут быть использованы для оценки работы аналитической системы как в определенное время, так и в течение более длительных интервалов времени.

Внутренний контроль качества - это окончательная проверка правильности выполнения всех процедур (включая калибровку), прописанных в аналитическом протоколе, и всех иных мер по обеспечению качества, на которых основана надлежащая аналитическая практика, поэтому ВКК в обязательном порядке является ретроспективным. Он также должен быть максимально независимым от аналитического протокола, особенно от калибровки, для проверки которой он предназначен.

Как контрольные материалы, так и материалы для калибровки должны по возможности иметь прослеживаемую связь с соответствующими сертифицированными эталонными материалами или признанным эмпирическим эталонным методом. Если это невозможно, контрольные материалы должны иметь прослеживаемость, по крайней мере, с материалом гарантированной чистоты или другим хорошо характеризуемым материалом. Однако эти два пути прослеживаемости не должны совпадать на слишком поздних стадиях аналитического процесса. Например, если контрольные материалы и калибровочные стандарты были приготовлены из одного стокового раствора аналита, ВКК не сможет обнаружить неточность, возникшую в результате неправильного приготовления стокового раствора.

В типичной ситуации анализа несколько, а возможно, и много схожих испытуемых материалов анализируют вместе, а контрольные материалы включают в группу. Часто анализы дублируют, для чего анализируют отдельные части одного и того же испытуемого материала. Такая группа материалов в настоящем документе называется аналитическим "прогоном" (слова "набор", "серия" и "партия" также используются как синонимы слова "прогон"). Считается, что анализ прогонов происходит при фактически постоянных условиях. Во время анализа прогона при идеальных условиях партии реагентов, настройки приборов, оператор и лабораторная среда остаются неизменными, поэтому систематические ошибки должны при анализе оставаться постоянными, как и значения параметров, описывающих случайные ошибки. Поскольку мониторинг этих ошибок представляет определенный интерес, то прогон является основной операционной единицей ВКК.
Поэтому считается, что прогон проводится в условиях повторяемости, т.е. случайные ошибки измерения имеют такую величину, которая могла бы возникнуть за "короткий" период времени. На практике анализ прогона может занять время, достаточное для того, чтобы произошли небольшие систематические изменения. Например, реагенты могут прийти в негодность, приборы могут сместиться, могут потребоваться незначительные корректировки в настройках приборов, или может повыситься температура в лаборатории.

Однако в целях ВКК подобное систематическое воздействие относятся к вариациям повторяемости. Размещение в случайном порядке материалов, составляющих прогон, преобразует результат смещения в случайные ошибки.

1.2 Область применения документа

В данном документе изложены упорядоченные процедуры ВКК, которые были разработаны в различных областях анализа, а именно, в клинической биохимии, геохимии, исследованиях окружающей среды, промышленной гигиене и анализе пищевых продуктов [3-9]. Методики, применяемые в этих сферах, во многом схожи. Аналитическая химия включает в себя еще более широкий диапазон мероприятий, все из которых должны быть охвачены основными принципами ВКК. Настоящий документ содержит рекомендации, которые будут применимы в большинстве случаев. Из процедур был обязательно исключен ряд практик ВКК, которые ограничиваются отдельными секторами аналитической сферы. Кроме того, в некоторых секторах принято сочетать указанные здесь меры ВКК с другими мерами по обеспечению качества. В таком сочетании нет ничего плохого, однако следует четко понимать, какие аспекты ВКК являются основными.

В целях гармонизации и изложения базового руководства по ВКК некоторые виды аналитической деятельности были исключены из данного документа. В частности, исключены следующие вопросы.

(i) *Контроль качества при отборе проб*. Несмотря на признание того, что качество аналитического результата может ниже качества пробы, контроль качества при отборе проб является отдельной темой и во многих областях проработан не полностью. Более того, во многих случаях аналитические лаборатории не имеют возможности контролировать процесс и качество отбора проб.

(ii) *Поточный анализ и непрерывный мониторинг*. При таком способе анализа отсутствует возможность повторить измерение, поэтому подход к ВКК из данного документа не применяется.

(iii) *Многомерный ВКК*. Многомерные методы ВКК все еще являются предметом исследования и считаются недостаточно проработанными, чтобы включить их в данный документ.

В настоящем документе исходят из того, что данные по множественным аналитам требуют проведения серии одномерных тестов ВКК. Необходимо проявлять осторожность при трактовке такого рода данных, чтобы избежать их неоправданно частого отклонения.
(iv) *Законодательные и договорные требования*.
(v) *Меры по обеспечению качества*, такие как проверка стабильности инструментария до и во время анализа, калибровка длины волны, калибровка баланса, испытание хроматографических колонок на разрешение и диагностика проблем не включены. Для настоящих целей они рассматриваются как часть протокола анализа, и ВКК проверяет их эффективность вместе с другими аспектами методологии.

1.3 Внутренний контроль качества и неопределенность

Необходимым условием аналитической химии является признание "соответствия целям", стандарта точности, который требуется для эффективного использования аналитических данных. Этот стандарт достигается, когда учитывается намеченное применение данных, однако редко можно предугадать все случаи будущего применения результатов анализа. По этой причине, чтобы предотвратить неправильную трактовку, важно, чтобы аналитические результаты сопровождались заявлением о неопределенности, всегда доступным для тех, кто хочет использовать данные.

Строго говоря, результат анализа не может быть интерпретирован, если неизвестно, какая неопределенность связана с заявленным уровнем достоверности. Этот принцип демонстрируется простым примером. Предположим, существует законодательное требование, согласно которому пищевой продукт не должен содержать более 10 $\mu g\ g^{-1}$ определенного компонента. Производитель анализирует партию и получает для компонента результат 9 $\mu g\ g^{-1}$. Если неопределенность результата, выраженная в виде полудиапазона (допуская, что ошибка выборки отсутствует), составляет 0,1 $\mu g\ g^{-1}$ (т.е. истинный результат с высокой вероятностью попадает в диапазон 8,9 - 9,1), то законодательный предел считается не превышенным. Если, напротив, неопределенность составляет 2 $\mu g\ g^{-1}$, то такой уверенности нет.

Как следствие, интерпретация и использование результатов измерения зависят от связанной с ними неопределенности.

Таким образом, результаты анализа должны иметь связанную с ними неопределенность, чтобы можно было придать им определенное значение или сделать обоснованную интерпретацию. Если это требование не может быть выполнено, то данные используются с ограничениями. Более того, достигнута ли требуемая неопределенность измерений, проверяется обычной процедурой, поскольку качество данных может меняться как в одной лаборатории с течением времени, так и между различными лабораториями. ВКК включает в себя процедуру проверки, направленную на установление, достигнута ли в ходе выполнения измерений требуемая неопределенность.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

2.1 Международные определения

Обеспечение качества: все запланированные и систематические действия, необходимые для того, чтобы обеспечить достаточную уверенность в том, что качество продукта или услуги будет удовлетворять заданным требованиям(10).

Истинность: степень близости среднего значения, полученного из большой серии результатов испытаний, к принятому эталонному значению(11).

Прецизионность: степень близости друг к другу независимых результатов испытаний, полученных при предписанных условиях(12).

Смещение: разность между ожидаемым значением результатов испытаний и принятым эталонным значением(11).

Точность: степень близости результата измерения к истинному значению измеряемой величины(13).

Примечание 1. Точность - это качественное понятие.

Примечание 2. Термин "прецизионность" не следует использовать для обозначения точности.

Ошибка: результат измерения за вычетом истинного значения измеряемой величины(13).

Условия повторяемости: условия, при которых независимые результаты испытаний получены одним и тем же методом на идентичных испытуемых объектах в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в течение коротких временных интервалов(11).

Неопределенность измерения: параметр, который связан с результатом измерения, характеризующим дисперсию значений, которые могут быть обоснованно отнесены к измеряемому веществу(14).

Примечание 1. Параметром может быть, например, стандартное отклонение (или его заданная кратность) или полуширина интервала с заданным уровнем достоверности.

Примечание 2. Неопределенность измерения, как правило, включает в себя много компонентов. Некоторые из них могут быть оценены на основе статистического распределения результатов по серии измерений и могут быть охарактеризованы экспериментальными стандартными отклонениями. Другие компоненты, которые также могут быть охарактеризованы стандартными отклонениями, оцениваются, исходя из предполагаемых распределений вероятности, основанных на опыте или другой информации.

Примечание 3. Подразумевается, что результат измерения является наилучшей оценкой значения измеряемой величины, и что все компоненты неопределенности, включая компоненты, возникающие в результате систематического воздействия, такие как компоненты, связанные с поправками и эталонами, способствуют дисперсии.

Прослеживаемость: свойство результата измерения или значения эталона, за счет которого он может быть связан с установленными эталонами, обычно национальными или международными стандартами, через непрерывную цепь сличений, неопределенность(13) которых установлена.

Эталонный материал: материал или вещество, одно из значений свойств которого настолько однородно и хорошо установлено, что его можно использовать для калибровки прибора, оценки метода измерения или для присвоения значений материалам(13).

Сертифицированный эталонный материал: сопровождаемый сертификатом эталонный материал, одно или несколько значений свойств которого сертифицированы в ходе процедуры по установлению его прослеживаемости до точной реализации

единицы, в которой выражены значения свойств, и для которого каждое сертифицированное значение сопровождается неопределенностью на установленном уровне доверия[13].

2.2 Определения терминов, характерных для данного документа

Внутренний контроль качества (ВКК): ряд процедур, выполняемых персоналом лаборатории для постоянного мониторинга за работой и результатами измерений, чтобы принять решение, являются ли результаты достаточно надежными для выпуска.

Контрольный материал: материал, используемый для внутреннего контроля качества и подвергаемый той же (полноценной или частичной) процедуре измерения, которая используется для испытуемых материалов.

Прогон (**аналитический прогон**): ряд измерений, выполняемых в условиях повторяемости.

Соответствие цели: показатель того, насколько полученные в процессе измерения данные позволяют пользователю принимать решения, корректные как в техническом, так и в административном плане, для достижения заявленной цели.

Аналитическая система: ряд условий, обуславливающих качество аналитических данных, в том числе оборудование, реагенты, процедуры, испытуемые материалы, персонал, окружающую среду и меры по обеспечению качества.

3. ПРАКТИКА ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА И ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1 Обеспечение качества

Обеспечение качества - это важнейшая организационная инфраструктура, которая лежит в основе всех надежных аналитических измерений. Она нацелена на достижение соответствующего уровня в таких вопросах, как обучение и управление персоналом, качество лабораторной среды,

безопасность, хранение, целостность и особенности проб, ведение записей, обслуживание и калибровка приборов, а также использование технически обоснованных и надлежащим образом документированных методов. Сбой в любом из этих пунктов может свести на нет ту активную работу, которая проводится по другим пунктам для получения данных желаемого качества. В последние годы эти практики были кодифицированы и официально признаны в качестве основных. Однако даже при преобладании благоприятных обстоятельств гарантировать, что данные будут иметь надлежащее качество, можно только при проведении ВКК.

3.2 Выбор аналитического метода

Важно, чтобы при выборе методов лаборатории ограничивались теми из них, которые были названы подходящими для соответствующей матрицы и аналита. У лаборатории должна иметься документация с описанием характеристик метода, которые были оценены в соответствующих условиях.

Использование метода само по себе не гарантирует, что будут достигнуты установленные показатели. Когда речь идет о каком-то конкретном методе, существует лишь вероятность того, что, если метод применяется при определенном наборе условий, то будет достигнут определенный стандарт надежности. Именно совокупность обстоятельств, известная как "аналитическая система", отвечает за точность аналитических данных. Следовательно, важно контролировать аналитическую систему, чтобы добиться соответствия цели. В этом и заключается цель мероприятий ВКК, проводимых в лаборатории.

3.3 Внутренний контроль качества и аттестационные испытания

Аттестационные испытания - это периодическая оценка работы отдельных лабораторий и групп лабораторий, в рамках которой независимый контрольный орган распределяет между участниками типовые материалы для неконтролируемого анализа[(2)]. Несмотря на свою важность, участие в аттестационных испытаниях не является заменой мерам ВКК или наоборот.

Схемы аттестационных испытаний можно рассматривать как рутинную, но относительно нечастую проверку аналитических ошибок. Если не поддерживать хорошо проработанную систему ВКК, то ценность участия в такой проверке ничтожно мала.

Вероятно, основным положительным эффектом от аттестационных испытаний является стимулирование участников к созданию эффективных систем контроля качества. Было показано, что лучшие результаты при аттестационных испытаниях[15] у лабораторий с эффективными системами ВКК.

4. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

4.1 Введение

Внутренний контроль качества включает в себя практические шаги, направленные на то, чтобы ошибки аналитически данных имели порядок величины, соответствующий их использованию. Практика ВКК зависит от использования двух стратегий: анализ эталонных материалов для контроля истинности и статистического контроля и дублирование для контроля прецизионности.

Основной подход к ВКК включает анализ как контрольных материалов, так и испытуемых материалов. Результаты анализа контрольных материалов служат основой для принятия решения о приемлемости данных испытаний. В этом контексте стоит отметить два ключевых момента.

(i) Интерпретация контрольных данных должна быть основана на документально подтвержденных объективных критериях и, по возможности, на статистических принципах.

(ii) Результаты контрольных анализов следует рассматривать в первую очередь как показатели эффективности работы аналитической системы и лишь во вторую очередь как руководство по ошибкам, связанным с отдельными результатами испытаний. Существенные изменения в кажущейся точности контрольных определений иногда могут быть приняты за аналогичные изменения данных для современных испытуемых материалов, но коррекция аналитических данных на основе этой предпосылки неприемлема.

4.2 Общий подход - статистический контроль

Интерпретация результатов анализов ВКК во многом зависит от концепции статистического контроля, которая соотносится со стабильностью работы. Статистический контроль подразумевает, что результат ВКК x можно интерпретировать как возникающий независимо и случайно из нормальной совокупности со средним значением μ и дисперсией σ^2.

При таких ограничениях только около 0,27% результатов (x) будут выходить за пределы $\mu \pm 3\sigma$. Когда встречаются такие экстремальные результаты, они считаются "неуправляемыми" и указывают на то, что аналитическая система начала вести себя иначе. Потеря контроля означает, что точность данных, которые получает система, неизвестна и, следовательно, на них нельзя полагаться. Поэтому аналитическая система требует исследования и принятия мер по исправлению ситуации перед проведением дальнейшего анализа. Соблюдение статистического контроля можно отслеживать графически по контрольным картам Шухарта (см. Приложение 1). Также возможен эквивалентный численный способ, сравнивающий значения $z = (x - \mu)/\sigma$ с соответствующими значениями стандартного нормального отклонения.

4.3 Внутренний контроль качества и соответствие цели

По большей части, в основе процесса ВКК лежит описание (с учетом статистических параметров) текущей аналитической системы при нормальном режиме работы. И контрольные пределы опираются на расчетные значения этих параметров, а не на показатели, выведенные с точки зрения соответствия цели. Контрольные пределы должны быть уже, чем требования к соответствию цели, иначе анализ будет нецелесообразным.

Однако концепция статистического контроля неуместна, когда проводится так называемый анализ *ad hoc*. В анализе *ad hoc* могут быть задействованы незнакомые или редко встречающиеся испытуемые материалы, а пробы часто состоят всего из нескольких таких испытуемых материалов. При таких обстоятельствах нет статистической основы для построения контрольных карт. В таких случаях для оценки приемлемости полученных результатов химику-аналитику приходится опираться на критерии «соответствие цели», исторические данные или соответствие визуальным свойствам испытуемого материала.

В любом случае, желательно иметь согласованные методы установления количественных критериев для того, чтобы характеризовать соответствие цели. К сожалению, это один из менее проработанных аспектов ВКК. Принципы для конкретных сфер применения могут быть разработаны на основе консенсуса. Например, при экологических исследованиях обычно признается, что относительная неопределенность менее 10 процентов в концентрации следовых аналитов редко имеет значение.

При анализе пищевых продуктов в качестве критерия «соответствие цели» иногда используется кривая Горвица[16]. Такие критерии были определены для клинического анализа[17,18]. В некоторых областях прикладной геохимии систематический подход позволил разработать критерии «соответствия цели» для отбора проб и прецизионности анализа. Однако здесь не представляется возможным дать рекомендации по этим областям, и в настоящее время не может быть предложено никаких общих принципов, которые позволили бы рассмотреть конкретные случаи применения.

4.4 Природа ошибок

Признают две основные категории аналитических ошибок, а именно, случайные ошибки и систематические ошибки, которые приводят к неточности и смещению соответственно. Важность классификации ошибок заключается в том, что они отличаются по источникам происхождения, способам устранения и последствиям для интерпретации данных.

Случайные ошибки определяют прецизионность измерения. Они вызывают случайные положительные и отрицательные отклонения результатов от базового среднего значения. *Систематические ошибки* заключаются в смещении среднего значения многих определений от истинного значения. Для целей ВКК стоит рассмотреть два уровня систематических ошибок.

(i) *Постоянное смещение* влияет на аналитическую систему (для данного типа испытуемого материала) в течение длительного периода времени и затрагивает все данные. Если такое смещение незначительно по сравнению со случайной ошибкой, то оно может быть идентифицировано только после длительной работы аналитической системы. Его можно считать допустимым при условии, что оно не выходит за установленные пределы.

(ii) *Эффект прогона* проявляется в отклонении аналитической системы при конкретном прогоне. Если этот эффект достаточно велик, то в момент возникновения он будет идентифицирован при ВКК как состояние вне контроля.

Традиционное разделение ошибок на случайные и систематические зависит от временных рамок, в которых рассматривается система. Эффекты прогона неизвестного происхождения могут рассматриваться в долгосрочной перспективе как проявление случайного процесса. В качестве альтернативы, если рассматривать более краткосрочную перспективу, то ту же вариацию можно считать изменением, которое подобно смещению влияет на конкретный прогон.
Статистическая модель, используемая для ВКК в настоящем документе, выглядит следующим образом[1]. Значение измерения (x) в конкретном прогоне определяется следующим образом:

x = истинное значение + постоянное смещение + эффект прогона + случайная ошибка (+ грубая ошибка).

Дисперсия x (σ_x^2) при отсутствии грубых ошибок задается следующим образом:

$$\sigma_x^2 = \sigma_0^2 + \sigma_1^2$$

где
σ_0^2 = дисперсия случайной ошибки (в рамках прогона) и
σ_1^2 = дисперсия эффекта прогона

Дисперсии истинного значения и постоянного смещения равны нулю. Подконтрольную аналитическую систему полностью можно описать с помощью σ_0^2 , σ_1^2 и значения постоянного смещения. Ошибки называют грубыми, когда аналитическая система не соответствует такому описанию.

5 ВКК И ПРЕЦИЗИОННОСТЬ В ПРЕДЕЛАХ ПРОГОНА

5.1 Прецизионность и дублирование

Для ограниченного контроля прецизионности внутри прогона выполняют дублирование в рамках одного цикла измерений, выполненных на испытуемых материалах. Цель – обеспечить, чтобы разность между парными результатами соответствовала или

[1] При необходимости модель может быть расширена, чтобы включить в себя другие характеристики аналитической системы

была лучше, чем заключенный в значении σ0 уровень, используемый лабораторией для ВКК[2]. Такой тест предупреждает пользователя о возможно плохой прецизионности в пределах прогона и дает дополнительную информацию для интерпретации контрольных карт. Метод особенно полезен при специальном анализе, когда внимание сосредоточено на одном прогоне, а информация, полученная из контрольных материалов, вряд ли будет полностью удовлетворительной.

При общем подходе все или случайно выбранные испытуемые материалы анализируются в двух экземплярах. Абсолютные различия $|d| = |x_1 - x_2|$ между дублированными результатами анализа x_1 и x_2 проверяют на соответствие верхнему контрольному пределу, обусловленному значением σ_0. Однако, если при прогоне у испытуемых материалов широкий диапазон концентраций аналита, единое значение σ_0 принять нельзя (19).

Повторы испытаний для ВКК должны по возможности отражать весь диапазон присутствующих в прогоне вариаций. Не следует их анализировать как соседние элементы прогона, иначе они покажут лишь минимально возможную меру аналитической изменчивости. Лучше всего в пределах каждого прогона размещать повторные испытания в случайном порядке. Более того, дублирование, необходимое для ВКК, требует полного и независимого анализа (предпочтительно слепого) отдельных порций испытуемого материала. Дублирование инструментальных измерений одного испытуемого раствора неэффективно, поскольку отсутствуют вариации, вносимые предварительной химической обработкой испытуемого материала.

5.2 Интерпретация повтора данных

5.2.1 *Узкий диапазон концентраций*. В простейшей ситуации испытуемые материалы, составляющие прогон, имеют небольшой диапазон концентраций аналитов, так что можно применять общее стандартное отклонение σ_0 в пределах прогона.

Чтобы обеспечить контрольный предел, необходимо оценить значение этого параметра. Верхняя 95% граница |d| составляет $2\sqrt{2}\ \sigma_0$, и в среднем только 3 из 1000 результатов должны превышать $3\sqrt{2}\ \sigma 0$.

[2] Здесь не предполагается оценивать стандартное отклонение повторяемости σ_r на основе данных ВКК или сравнивать оценки: для удовлетворительного результата обычно слишком мало результатов. Если такая оценка потребуется, то можно использовать формулу: $s_r = \sqrt{\sum d^2 / 2n}$.

Группа из *n* дублированных результатов может быть интерпретирована несколькими способами.

Например, стандартизированная разность $z_d = d / \sqrt{2}\,\sigma_0$ должна иметь нормальное распределение с нулевым средним и единичным стандартным отклонением. Сумма группы из *n* таких результатов будет иметь стандартное отклонение $\sqrt{n}$, так что только примерно 3 прогона из 1000 дадут значение $|\sum z_d| > 3\sqrt{n}$. В качестве альтернативы группа из *n* значений z_d из прогона может быть объединена для получения $\sum z_d^2$ и результат интерпретирован как выборка из распределения χ^2с *n* степенями свободы (χ_n^2). Необходимо соблюдать некоторую осторожность при использовании этой статистики, так как она чувствительна к отклоняющимся от нормы результатам.

5.2.2 Широкий диапазон концентраций. Если испытуемые материалы, входящие в прогон, имеют широкий диапазон концентраций аналита, общий стандарт прецизионности (σ_0) принять нельзя. В этом случае σ_0 должно быть выражено в виде функциональной зависимости от концентрации. Значение концентрации для конкретного материала принимают равным ($x_1 + x_2$)/2, а соответствующее значение σ_0 получают из функциональной зависимости, параметры которой должны быть оценены заранее.

6. КОНТРОЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ВКК

6.1 Введение

Контрольные материалы - характеризуемые вещества, которые вводятся в прогон вместе с испытуемыми материалами и подвергаются точно такой же обработке.

Контрольный материал должен содержать соответствующую концентрацию аналита и ему должно быть присвоено значение этой концентрации. Контрольные материалы выступают в качестве заменителей испытуемых материалов и поэтому должны быть репрезентативными, т.е. должны подвергаться воздействию тех же потенциальных источников ошибок. Чтобы быть полностью репрезентативным, контрольный материал должен иметь такую же матрицу основного состава, включая незначительные компоненты, которые могут влиять на точность.

Он также должен иметь такую же физическую форму, т.е. измельчение, как и испытуемые материалы.

Существуют и другие существенные характеристики контрольного материала. Он должен быть достаточно стабильным в течение необходимого периода времени. Должна быть возможность разделить контрольный материал для анализа на фактически идентичные порции. Часто он требуется в больших количествах для использования в течение длительного периода времени.

Для ВКК эталонные материалы используют в сочетании с контрольными картами, которые позволяют учитывать как постоянное смещение, так и эффекты прогона (Приложение 1). Постоянное смещение проявляется в виде значительного отклонения средней линии от заданного значения. Вариация эффекта прогона предсказуема при стандартном отклонении, когда система находится под статистическим контролем, и это стандартное отклонение используется для определения пределов действий и предупреждений на соответствующих расстояниях на соответствующих расстояниях от истинного значения.

6.2 Роль сертифицированных эталонных материалов

Сертифицированные эталонные материалы (СЭМ) согласно разделу 2 (т.е. с заявлением о неопределенности и прослеживаемости) - когда доступны и имеют подходящий состав - являются идеальными контрольными материалами, т.к. могут рассматриваться в целях прослеживаемости как конечные стандарты истинности[20]. В прошлом СЭМ использовали только в справочных целях, а не для текущей практики. Более современный подход предлагает рассматривать СЭМ как расходный материал, что делает их пригодными для ВКК.

Однако подобное использование СЭМ связано с рядом ограничений.

(i) Несмотря на постоянно растущий ассортимент, для большинства анализов подходящие СЭМ отсутствуют.

(ii) Хотя стоимость СЭМ не является чрезмерно высокой относительно общей стоимости анализа, лаборатория, осуществляющая широкий спектр деятельности, может быть в не состоянии хранить все соответствующие виды эталонных материалов.

(iii) Понятие эталонного материала не применимо к материалам, в которых либо матрица, либо аналит нестабильны.
(iv) СЭМ не всегда доступны в количестве, достаточном для проведения ВКК в течение продолжительного периода времени.
(v) Важно помнить, что не у всех сертифицированных эталонных материалов одинаковое качество. Следует проявлять осторожность, если в сертификате указана недостоверная информация.
Если по какой-либо из вышеперечисленных причин использование СЭМ не представляется целесообразным, отдельные лаборатории или группы лабораторий должны подготовить свои собственные контрольные материалы и присвоить им прослеживаемые[3] значения концентрации аналита. Такой материал иногда называют "собственным эталонным материалом". Рекомендации по подготовке собственных эталонных материалов перечислены в Разделе 6.3. Описанные там методы применимы не ко всем аналитическим ситуациям.

6.3 Подготовка контрольных материалов

6.3.1 *Присвоение истинного значения при анализе*. Рабочее значение, в принципе, может быть присвоено стабильному эталонному материалу в результате тщательного анализа. Однако необходимо принять меры предосторожности, чтобы в присвоенном значении избежать смещения. Для этого необходима независимая проверка, которую можно обеспечить при анализе материалов несколькими лабораториями и, по возможности, при использовании методов, основанных на различных физико-химических принципах. Недостаток внимания к независимой валидации контрольных материалов, как оказалось, является слабым местом в системах ВКК(15).

Один из способов установить прослеживаемое заданное значение в контрольном материале - анализ прогона, включающего материал-кандидат и подборку подходящих СЭМ, с повторением и рандомизацией. Этот способ подходит при ограниченном количестве СЭМ. СЭМ должны подходить как по составу матрицы, так и по концентрации аналитов. СЭМ используют

[3] При отсутствии СЭМ может потребоваться прослеживаемость только к эталонному методу или к партии реагента, поставляемого производителем.

непосредственно для калибровки аналитической процедуры при анализе контрольного материала. Обязательным условием такого подхода является наличие соответствующего аналитического метода. Было бы рискованно, если бы, скажем, для измерения была выделена незначительная и непостоянная часть аналита.
Необходимо также учитывать неопределенность, вносимую в установленное значение.

6.3.2 *Материалы, валидированные при аттестационных испытаниях,* представляют собой ценный источник контрольных материалов. Эти материалы были проанализированы различными методами во многих лабораториях. При отсутствии противопоказаний, таких как очевидное смещение или нетипичное частотное распределение результатов, консенсус лабораторий можно считать подтвержденным установленным значением, с которым можно соотнести значимую неопределенность (не исключено, что консенсус может пострадать из-за существенного смещения, но такая вероятность всегда присутствует в эталонных значениях). Существует теоретическая проблема, связанная с установлением прослеживаемости такого значения, но это не умаляет валидности предлагаемой процедуры. Если ассортимент материалов ограничен, организаторы аттестационных испытаний могут обеспечить их в большом объеме, подготовив партии материала в количестве, превышающем непосредственные потребности. Потребуется подтвердить, что обычные требования стабильности будут соблюдаться.

6.3.3 *Присвоение истинного значения по формуле*. В подходящих случаях контрольный материал можно приготовить простым смешиванием компонентов известной чистоты в заранее определенных количествах. Например, такой подход, как правило, подходит, когда в роли контрольного материала выступает раствор. При составлении рецептур часто проблематично получить твердые контрольные материалы в удовлетворительном физическом состоянии или обеспечить реалистичность видового и физического распределения аналита в матрице. Кроме того, необходимо обеспечить адекватное смешивание компонентов.

6.3.4 *Контрольные материалы с добавками*. "Введение добавки" - это способ создания контрольного материала, значение которому присваивается через сочетание рецептуры и анализа. Этот метод возможен, когда имеется испытуемый материал, практически не содержащий аналит. После проведения исчерпывающих аналитических проверок с целью убедиться, что уровень фона достаточно низкий, в материал добавляют известное количество аналита. Эталонный материал, подготовленный таким образом, имеет ту же матрицу, что и испытуемые материалы, и известный уровень аналита - неопределенность в установленной концентрации ограничивается только возможной ошибкой в определении без введения внутреннего стандарта. Однако может быть трудно обеспечить, чтобы видоспецификация, связывание и физическая форма добавленного аналита были такими же, как у исходного аналита, и чтобы смешивание было адекватным.

6.3.5 *Проверка извлечения*. Если использование эталонного материала нецелесообразно, то ограниченный контроль смещения возможен путем проверки извлечения. Это особенно полезно, когда невозможно стабилизировать аналиты или матрицы или когда проводится анализ *ad hoc*. В исследуемую порцию испытуемого материала вводят известное количество аналита и анализируют вместе с исходным испытуемым материалом. Извлечение добавленного аналита (известное как "предельное извлечение") - это разница между двумя измерениями, поделенная на введенное количество. Очевидные преимущества проверки извлечения заключаются в том, что матрица является репрезентативной, а подход - широко применимым: в большинство испытуемых материалов можно ввести внутренний стандарт. Однако проверка извлечения имеет недостаток, отмеченный ранее в отношении состава, связывания и физического распределения аналита. Кроме того, предположение о равнозначном извлечении аналита, добавленного в качестве внутреннего стандарта, и исходного аналита может быть недействительным. Но, как правило, можно предположить, что низкие показатели при проверке извлечения в значительной степени указывают на аналогичные или худшие показатели для исходного аналита в испытуемых материалах.

Тестирование с добавкамии и извлечением как метод ВКК следует отличать от метода со стандартными добавками, который является процедурой измерения: один ввод внутреннего стандарта не может служить ни для измерения, ни для ВКК.

6.4 Холостые определения

Холостые определения почти всегда являются неотъемлемой частью аналитического процесса и могут удачно выполняться параллельно с протоколом ВКК. Простейшей формой холостого определения является "реагентное холостое определение", когда аналитическая процедура выполняется полностью, кроме добавления испытуемой порции. При этом типе холостого определения проверяют, по сути, не только чистоту реагентов. Например, с его помощью можно обнаружить загрязнение аналитической системы из-за любой причины, например, из-за стеклянной посуды и окружающей среды, и поэтому его лучше назвать "процедурным холостым определением". В некоторых случаях лучший результат достигается, если холостые определений выполняют с использованием имитирующего испытуемого материала. Имитатором может выступать фактический испытуемый материал, который заведомо практически не содержит аналитов, или суррогатом (например, беззольная фильтровальная бумага, используемая вместо растительного материала). Там, где возможно, лучшим типом холостой пробы является "полевая холостая проба", которая представляет собой типичную матрицу с нулевой концентрацией аналита.

Ненадлежащий набор холостых проб в прогоне может указывать на спорадическое загрязнение и сделать более весомыми факты ВКК, позволяющие отклонить результаты. Если аналитический протокол предписывает вычесть холостое значение, то оно должно быть также вычтено из результатов контрольных материалов до их использования при ВКК.

6.5 Прослеживаемость при проверках с вводом и извлечением добавок

Необходимо принимать меры против возможных проблем с прослеживаемостью реагентов, используемых при проверках с вводом и извлечением добавок. В условиях, когда сертифицированные эталонные материалы недоступны,

прослеживаемость, как правило, можно установить только до партии аналита, предоставленной производителем. В таких случаях перед использованием необходимо подтвердить идентичность и проверить чистоту. Еще одна мера предосторожности заключается в том, чтобы калибровочные стандарты и добавки не прослеживались до одного и того же исходного раствора аналита или одного и того же аналитика. Если такая общая прослеживаемость существует, то ВКК не сможет обнаружить источники ошибки.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ

Следующие рекомендации представляют собой комплексные подходы к ВКК, которые подходят для многих видов анализа и областей применения. Специалисты по лабораторным системам качества должны будут согласовать данные рекомендации с принятыми у них требованиями. Такое согласование может быть осуществлено, например, путем регулирования количества дубликатов и контрольного материала, вводимого в прогон, или путем включения любых дополнительных мер, которые считаются предпочтительными в конкретной области применения. Избранная в итоге процедура и сопутствующие ей правила принятия решений должны быть зафиксированы в протоколе ВКК, который ведется обособленно от протокола аналитической системы.

Практический подход к контролю качества определяется частотой, с которой проводятся измерения, а также размером и характером каждого прогона. В связи с этим предлагаются следующие рекомендации. Использование контрольных карт и правил принятия решений описано в Приложении 1.

В каждом из следующих случаев порядок проведения анализа различных материалов должен быть, по возможности, случайным. Неслучайный порядок может привести к тому, что различные компоненты погрешности будут недооценены.

(i) *Короткие (например, n<20) частые прогоны одинаковых материалов*. В этом случае диапазон концентраций аналита в прогоне относительно невелик, поэтому можно принять общее значение стандартного отклонения.

Контрольный материал вводят, по крайней мере, один раз за прогон. На соответствующую контрольную карту наносят либо отдельные полученные значения, либо среднее значение. Не менее половины

испытуемых материалов, выбранных случайным образом, анализируют в двух экземплярах. Вводят хотя бы одно холостое определение.
(ii) *Более длительные (например, n>20) частые прогоны аналогичных материалов*. Также допускается общий уровень стандартного отклонения.
Контрольный материал вводят с примерной частотой 1 на 10 испытуемых материалов. Если размер прогона варьируется от прогона к прогону, проще стандартизировать фиксированное количество вводов в каждом прогоне и выставить среднее значение на контрольной диаграмме средних значений. В противном случае строят график отдельных значений. Минимум пять испытуемых материалов, выбранных случайным образом, анализируют в двух экземплярах. На 10 испытуемых материалов вводят 1 холостое определение.

(iii) *Частые пробы, содержащие аналогичные материалы, но с широким диапазоном концентрации аналита*. Здесь мы не можем предполагать, что применимо одно значение стандартного отклонения.
Контрольные материалы вводят в общем количестве, примерно соответствующем рекомендованному выше. Однако должно быть представлено как минимум два уровня аналита, один из которых близок к медианному уровню типичных испытуемых материалов, а другой находится примерно в верхнем или нижнем дециле, в зависимости от ситуации. Значения для двух контрольных материалов наносят на отдельные контрольные карты. Дублируют не менее пяти испытуемых материалов и вводят 1 процедурное холостое определение.

(iv) *Анализ ad hoc*. Здесь понятие статистического контроля неприменимо. Однако предполагается, что материалы в прогоне относятся к одному типу, т.е. достаточно похожи, чтобы можно было сделать общие выводы об ошибках.

Проводят дублирующий анализ всех испытуемых материалов. Проводят испытание с вводом внутреннего стандарта или с извлечением, или используют контрольный материал с соответствующим количеством вводов (см. выше) и, при необходимости, с различными концентрациями аналита. Проводят холостые определения. Если контрольные пределы отсутствуют, сравнивают смещение и прецизионность с пределом соответствия цели или другими установленными критериями.

8. ВЫВОДЫ

Внутренний контроль качества - важный аспект, способствующий тому, чтобы выпускаемые лабораторией данные соответствовали цели. При надлежащем исполнении методы контроля качества помогают проверять различные аспекты качества данных на основе каждого отдельного прогона. В тех прогонах, когда показатели выходят за допустимые пределы, полученные данные могут быть отбракованы, а после исправления ситуации в аналитической системе анализ может быть повторен. Следует подчеркнуть, что даже при правильном выполнении внутренний контроль качества не защищен от ошибки. Очевидно, что он подвержен "ошибкам обоих видов", т.е. подконтрольные прогоны иногда могут быть отбракованы, а бесконтрольные - приняты. Что еще более важно, ВКК, как правило, не может выявить спорадические грубые ошибки или кратковременные нарушения в аналитической системе, которые влияют на результаты по отдельным испытуемым материалам. Более того, выводы, основанные на результатах ВКК, применимы только к испытуемым материалам, которые попадают в область валидации аналитического метода. Несмотря на эти ограничения, которые при профессиональном и внимательном подходе можно в определенной степени смягчить, внутренний контроль качества остается основным доступным средством, обеспечивающим на выходе из лаборатории только данные надлежащего качества. При правильном исполнении ВКК показывает действенные результаты.

И наконец, необходимо понимать, что неукоснительное следование любой системе проверки качества не гарантирует получения данных надлежащего качества. Также требуется документировать и исполнять соответствующий порядок получения обратной связи, устранения несоответствий и мотивации сотрудников. Другими словами, успешное применение программы внутреннего контроля качества зависит того, насколько лаборатория действительно заинтересована в получении качества, т.е. ВКК должен стать частью общей системы обеспечения качества.

9. ИСТОЧНИКИ

1 *"Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies"*, Edited W Horwitz, *Pure Appl. Chem.,* 1988, **60**, 855-864. *(Revision in press*)

2 *"The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories"*, Edited M Thompson and R

Wood, *Pure Appl. Chem.,* 1993, **65**, 2123-2144. (Also published in *J. AOAC International*, 1993, **76**, 926-940.

3 *"IFCC approved recommendations on quality control in clinical chemistry. Part 4: internal quality control*", *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.,* 1980, **18**, 534-541.

4 S Z Cekan, S B Sufi and E W Wilson, *"Internal quality control for assays of reproductive hormones: Guidelines for laboratories".* WHO, Geneva, 1993.

5 M Thompson, "*Control procedures in geochemical analysis",* in R J Howarth (Ed*), "Statistics and data analysis in geochemical prospecting",* Elsevier, Amsterdam, 1983.

6 M Thompson, *"Data quality in applied geochemistry: the requirements and how to achieve them", J. Geochem. Explor.*, 1992, **44**, 3-22.

7 Health and Safety Executive, *"Analytical quality in workplace air monitoring",* London, 1991.

8 *"A protocol for analytical quality assurance in public analysts' laboratories*", Association of Public Analysts, 342 Coleford Road, Sheffield S9 5PH, UK, 1986.

9 *"Method evaluation, quality control, proficiency testing" (AMIQAS PC Program),* National Institute of Occupational Health, Denmark, 1993.

10 ISO 8402:1994. *"Quality assurance and quality management - vocabulary".*

11 ISO 3534 -1: 1993 (E/F). "*Statistics, vocabulary and symbols - Part 1: Probability and general statistical terms".*

12 ISO Guide 30:1992. *"Terms and definitions used in connections with reference materials"*

13 *"International vocabulary for basic and general terms in metrology"* , 2nd Edition, 1993, ISO, Geneva.

14 *"Guide to the expression of uncertainty in measurement",* ISO, Geneva, 1993.

15 M Thompson and P J Lowthian, *Analyst*, 1993, **118**, 1495-1500.

16 W Horwitz, L R Kamps and K W Boyer, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* 1980, **63**, 1344.

17 D Tonks, *Clin. Chem.,* 1963, **9**, 217-223.

18 G C Fraser, P H Petersen, C Ricos and R Haeckel, *"Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry", Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.,* 1992, **30**, 311-317.

19 M Thompson, *Analyst*, 1988, **113**, 1579-1587.

20 ISO Guide 33: 1989, *"Uses of Certified Reference Materials"*, Geneva

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. КОНТРОЛЬНЫЕ КАРТЫ ШУХАРТА

1. ВВЕДЕНИЕ

В многочисленных работах, посвященных контролю качества процессов и прикладной статистике, а также в нескольких стандартах ISO[2-5] подробно описаны теория, построение и интерпретация карт Шухарта[1]. Существует обширная литература, посвященная тому, как использовать контрольные карты в клинической химии[6,7]. Вестгард с соавторами сформулировали множество правил для интерпретации таких контрольных карт[8], результаты их применения были подробно изучены[9-10]. В настоящем приложении рассматриваются только простые карты Шухарта.

Чтобы построить контрольную карту Шухарта при ВКК, на вертикальной оси против номера прогона, расположенного на горизонтальной оси, откладывают значения концентрации, измеренные на контрольном материале в последовательных прогонах. Если в ходе одного прогона проводится более одного анализа конкретного контрольного материала, то для построения контрольной карты могут быть использованы либо отдельные результаты x, либо среднее значение $\bar{x}$.

График дополняется горизонтальными линиями, полученными из нормального распределения $N(\mu, \sigma^2)$, которое берется для описания случайных вариаций в построенных значениях. Линии выбранные для контроля: $\mu \pm 2\sigma$ и $\mu \pm 3\sigma$. Для карт по отдельным значениям и средним значениям требуются разные значения σ. Для системы статистического контроля в среднем примерно одно из двадцати значений выходит за пределы линий $\mu \pm 2\sigma$, называемых "предупредительная граница", и только примерно три из тысячи выходят за пределы линий $\mu \pm 3\sigma$, т.н."границы действия". На практике для построения карты используются оценки $\bar{x}$ и s параметров μ и σ. Значительная разность между $\bar{x}$ и заданным значением указывает на постоянное смещение.

2. ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ μ И σ

В контролируемой аналитической системе присутствуют два источника случайной вариации: внутрипрогонная, характеризуемая дисперсией σ_0^2, и межпрогонная с дисперсией σ_1^2. Эти две дисперсии обычно сравнимы по величине. Стандартное отклонение σ_x, используемое в карте с отдельными значениями, дается следующим образом:

$\sigma_x = (\sigma_0^2 + \sigma_1^2)^{1/2}$

тогда как для контрольной карты со средними значениями стандартное отклонение дается в виде: $\sigma_{\bar{x}} = (\sigma_0^2 / n + \sigma_1^2)$

где *n* - количество контрольных измерений в прогоне, на основе которых рассчитывается среднее значение. Таким образом, значение *n* должно быть постоянным от прогона к прогону, иначе невозможно будет определить контрольные границы. Если закрепленное число повторений контрольного материала за один прогон не может быть гарантировано (например, если у прогона переменная длина), то необходимо использовать карты с отдельными значениями. Кроме того, уравнение указывает, что σ_x или $\sigma_{\bar{x}}$ следует оценивать с осторожностью. Попытка обосновать оценку повторными значениями из одного прогона приведет к неоправданно узким контрольным пределам.

Из этого следует, что оценки должны включать межпрогонный компонент дисперсии. Если вначале предполагается использование определенного значения *n*, то $\sigma_{\bar{x}}$ можно оценить непосредственно по средним значениям *m* $\overline{x_1} = \sum_{j=1}^{n} x_{ij}\, n$

(*i* = 1,....., *m*) из *n* повторений в каждом из *m* последовательных прогонов. Таким образом, оценка μ составляет:

$$\bar{x} = \sum_{i} \bar{x} \,/\, m$$

и оценка $\sigma_{\bar{x}}$ составляет

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_1 (\overline{x_1} - \bar{x})^2}{m-1}}$$

Если значение *n* не предопределено, то отдельные оценки σ_0 и σ_1 могут быть получены с помощью одностороннего дисперсионного анализа. Если средние квадраты внутри и между группами равны MS_w и MS_b соответственно, то

σ_0^2 оценивается через MS_W и

σ_1^2 оценивается через (MS_b - MS_W)/*n*

Часто на практике приходится начинать построение контрольной карты с данных, собранных из небольшого числа прогонов, которые могут быть в некоторой степени нерепрезентативными, т.к. оценки стандартного отклонения очень изменчивы, если не использовать большое количество наблюдений. Более того, в начальный период условия, выходящие за рамки контроля, возникают чаще, чем обычно, и приводят к появлению отклоняющихся значений.

Такие значения будут смещать $\bar{x}$ и завышать s сверх должного значения, поэтому целесообразно пересчитать $\bar{x}$ и s после дополнительного периода "успокоения". Один из методов, как можно устранить влияние выбросов при расчете – отбраковать их после Q-теста Диксона или теста Граббса[11], а затем использовать классическую статистику, приведенную выше. В качестве альтернативы к данным можно применить методы робастной статистики[12, 13].

3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КОНТРОЛЬНЫХ КАРТ

К контрольным картам с отдельными результатами или средними показателями можно применять следующие простые правила.

Одиночная контрольная карта. Одно из следующих событий сигнализирует о состоянии выхода из-под контроля в аналитической системе.

(i) Текущее значение карты выходит за пределы действия.

(ii) Текущее значение и предыдущее значение карты выходят за пределы предупреждения, но находятся в пределах действий.

(iii) Девять последовательных значений карты лежат по одну сторону средней линии.

Две контрольные карты. Когда в каждом прогоне используются два разных контрольных материала, то соответствующие контрольные карты рассматриваются параллельно. При этом увеличивается вероятность ошибки первого типа (отбраковка корректного прогона), но уменьшается вероятность ошибки второго типа (принятие некорректного прогона). На внеконтрольное состояние будет указывать одно из следующих событий.

(i) По крайней мере, одно из значений карты выходит за пределы действия.
(ii) Оба значения карты выходят за пределы предупреждения.
(iii) Текущее и предыдущее значения на одной и той же контрольной карте выходят за пределы предупреждения.
(iv) Обе контрольные карты одновременно показывают, что четыре последовательных значения лежат по одной стороне средней линии.
(v) Одна из карт показывает девять последовательных значений, лежащих по одну сторону средней линии.

Контрольную карту можно рассмотреть более детально, если следовать подробным правилам Вестгарда, проиллюстрированным на рисунке 2.

При состоянии, выходящим из-под контроля, химик-аналитик должен прекратить анализ вплоть до проведения диагностических испытаний и исправления ситуации с последующим исключением результатов прогона и повторением анализа испытуемых материалов.

4. БИБЛИОГРАФИЯ

1 W A Shewhart, *"Economic control of quality in manufactured product"*, Van Nostrand, New York, 1931.
2 Стандарт ISO 8258:1991. *"Контрольные карты Шухарта"*.
3 Стандарт ISO 7873:1993 *"Контрольные карты для средних арифметических с пределами предупреждения"*.
4 Стандарт ISO 7870:1993. *"Контрольные карты – общее руководство и введение"*.
5 Стандарт ISO 7966:1993. *"Карты приемочного контроля"*.
6 S Levey and E R Jennings, *Am. J. Clin. Pathol.,* 1950, **20**, 1059-1066.
7 A B J Nix, R J Rowlands, K W Kemp, D W Wilson and K Griffiths, *Stat. Med*., 1987,**6**,425-440.
8 J O Westgard, P L Barry and M R Hunt, *Clin. Chem.,* 1981, **27**, 493-501.
9 C A Parvin, *Clin. Chem*., 1992, **38**, 358-363.
10 J Bishop and A B J Nix, *Clin. Chem*., 1993, **39**, 1638-1649.
11 W Horwitz, *Pure Appl. Chem*., (in press).
12 Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1989, **114**, 1693-1697.
13 Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1989, **114**, 1699-1702.

Отчет по техническим вопросам, рассмотренным на симпозиуме «Гармонизация системы обеспечения качества для аналитических лабораторий», Вашингтон, США, 22-23 июля 1993 год, при финансовой поддержке IUPAC, ISO и AOAC International.

Подготовлено к публикации MICHAEL THOMPSON[1] и ROGER WOOD[2]

[1]Кафедра химии, Birkbeck College (University of London), London WC1H OPP, UK
2Научная лаборатория по продуктам питания MAFF, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UQ, UK

Рабочая группа за период 1991-95 гг.:
Председатель: M. Parkany (Швейцария); Участники: T. Anglov (Дания); K. Bergknut (Норвегия и Швеция); P. De Bièvе (Бельгия); K.-G. von Boroviczény (Германия); J.M. Christensen (Дания); T.D. Geary (Южная Австралия); R. Greenhalgh (Канада); A.J. Head (Соединенное Королевство); P.T. Holland (Новая Зеландия); W. Horwitz (США). A. Kallner (Швеция); J. Kristiansen (Дания); S.H.H. Olrichs (Нидерланды); N. Palmer (США). M. Thompson (Соединенное Королевство); M.J. Vernengo (Аргентина); R. Wood (United Kingdom).

Практическое руководство по валидации, контролю качества и оценке неопределенности альтернативного метода энологического анализа

(Резолюция 10/2005)

Содержание

1. ЦЕЛЬ…… 5

2. ПРЕАМБУЛА И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 5

3. СЛОВАРЬ ОБЩИХ ТЕРМИНОВ 6

4. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ 12

4.1 МЕТОДОЛОГИЯ 12
4.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОШИБОК ИЗМЕРЕНИЯ 13

5. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА 14

5.1 МЕТОДОЛОГИЯ 14
5.2 РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ: ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА 15
5.2.1 Определение анализируемых матриц 15
5.2.2 Предел обнаружения и количественного определения 15
5.2.2.1 *Нормативное определение* 16
5.2.2.2 Справочная документация 16
5.2.2.3 Способ применения 16
5.2.2.4 Проведение исследования 16
5.2.2.4.1 Определение на холостой пробе 16
5.2.2.4.1.1 Область применения 16
5.2.2.4.1.2 Стандартный протокол и расчет 17
5.2.2.4.2 Подход с исследованием линейности 18
5.2.2.4.2.1 Область применения 18
5.2.2.4.2.2 Стандартный протокол и расчет 19
5.2.2.4.3 Подход с построением графика на основе фонового шума записи 21
5.2.2.4.3.1 Область применения 21
5.2.2.4.3.2 Стандартный протокол и расчет 21
5.2.2.4.4 Проверка предопределенного предела количественного определения 21
5.2.2.4.4.1 Область применения … 21
5.2.2.4.4.2 Стандартный протокол и расчет 22
5.2.3 Устойчивость … 24
5.2.3.1 Определение термина 24
5.2.3.2 Determination 24
5.3 РАЗДЕЛ ВТОРОЙ: ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ОШИБКИ 24
5.3.1 Исследование линейности … 24
5.3.1.1 Нормативное определение 24
5.3.1.2 Справочная документация 24
5.3.1.3 Применение 24

5.3.1.4 Подход типа ISO 11095 25
5.3.1.4.1 Стандартный протокол 25
5.3.1.4.2 Расчеты и результаты 26
5.3.1.4.2.1 Определение модели регрессии 26
5.3.1.4.2.2 Оценка параметров 27
5.3.1.4.2.3 Графики 27
5.3.1.4.2.4 Проверка предположения о линейности 29
5.3.1.4.2.4.1 Определения ошибок, связанных с калибровкой 29
5.3.1.4.2.4.2 Тест Фишера-Снедекора 31
5.3.1.5 Подход типа ISO 8466…..... 32
5.3.1.5.1 Стандартный протокол 32
5.3.1.5.2 Расчеты и результаты 33
5.3.1.5.2.1 Определение модели линейной регрессии 33
5.3.1.5.2.2 Определение модели полиномиальной регрессии 33
5.3.1.5.2.3 Сравнение остаточных стандартных отклонений..... 34
5.3.2 Специфичность 36
5.3.2.1 Нормативное определение 36
5.3.2.2 Применение 36
5.3.2.3 Процедуры 36
5.3.2.3.1 Испытание на добавление стандарта 36
5.3.2.3.1.1 Область применения 36
5.3.2.3.1.2 Стандартный протокол 36
5.3.2.3.1.3 Расчеты и результаты 37
5.3.2.3.1.3.1 Исследование прямой регрессии ***r = a + b.v***..... 37
5.3.2.3.1.3.2 Анализ результатов 38
5.3.2.3.1.3.3 Графики с перекрывающимися прямыми 40
5.3.2.3.2 Исследование влияния других соединений на результат измерения..... 40
5.3.2.3.2.1 Область применения 40
5.3.2.3.2.2 Стандартный протокол и расчет …..... 40
5.3.2.3.2.3 Интерпретация 41
5.3.3 Исследование точности метода 43
5.3.3.1 Описание этапа 43
5.3.3.1.1 Определение термина 43
5.3.3.1.2 Общие принципы 43
5.3.3.1.3 Справочная документация 43
5.3.3.2 Сравнение альтернативного метода с эталонным методом МОВВ 44
5.3.3.2.1 Область применения 44
5.3.3.2.2 Точность альтернативного метода по сравнению с эталонным методом . 44
5.3.3.2.2.1 Определение термина 44
5.3.3.2.2.2 Область применения…..... 44
5.3.3.2.2.3 Стандартный протокол и расчет …..... 44
5.3.3.2.2.4 Интерпретация 46
5.3.3.3 Сравнение межлабораторных испытаний 47
5.3.3.3.1 Область применения 47
5.3.3.3.2 Стандартный протокол и расчет 48
5.3.3.3.3 Интерпретация 49
5.3.3.4 Сравнение с эталонными материалами 50
5.3.3.4.1 Область применения 50
5.3.3.4.2 Стандартный протокол и расчет 50
5.3.3.4.3 Интерпретация 51
5.4 РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ: ИССЛЕДОВАНИЕ СЛУЧАЙНЫХ ОШИБОК 52
5.4.1 Общий принцип …..... 52

5.4.2 Справочная документация 53
5.4.3 Прецизионность метода 53
5.4.3.1 Определение термина 53
5.4.3.2 Область применения 53
5.4.3.3 Общий теоретический пример 54
5.4.3.3.1 Стандартный протокол и расчет 54
5.4.3.3.1.1 Расчеты с несколькими испытуемыми материалами 54
5.4.3.3.1.2 Расчеты с одним испытуемым материалом 56
5.4.3.4 Повторяемость 57
5.4.3.4.1 Определения терминов 57
5.4.3.4.2 Область применения 58
5.4.3.4.3 Стандартный протокол и расчет 58
5.4.3.4.3.1 Общий случай 58
5.4.3.4.3.2 Частный случай, применимый только к 1 повторению..... 58
5.4.3.4.4 Сравнение повторяемости 60
5.4.3.4.4.1 Определение повторяемости каждого метода 60
5.4.3.4.4.2 Тест Фишера-Снедекора 61
5.4.3.5 Внутрилабораторная воспроизводимость 62
5.4.3.5.1 Определение термина 62
5.4.3.5.2 Область применения 62
5.4.3.5.3 Стандартный протокол и расчет 62
6. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА МЕТОДОВ АНАЛИЗА (ВКК) 64
6.1 СПРАВОЧНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ..... 64
6.2 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ 64
6.3 СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ 64
6.4 ПРОВЕРКА АНАЛИТИЧЕСКОЙ СЕРИИ 66
6.4.1 Определение термина 66
6.4.2 Проверка точности с использование эталонных материалов 66
6.4.3 Внутрисерийная прецизионность 66
6.4.4 Внутренний стандарт 67
6.5 ПРОВЕРКА АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ 67
6.5.1 Определение термина 67
6.5.2 Карта Шухарта 67
6.5.2.1 Сбор данных 67
6.5.2.2 *Представление результатов и определение пределов* 68
6.5.2.3 Использование карты Шухарта 69
6.5.3 Внутренне сравнение аналитических систем 70
6.5.4 Внешнее сравнение аналитических систем 70
6.5.4.1 Аналитическая цепочка межлабораторных сравнений 70
6.5.4.2 Сравнение с внешними эталонными материалами 70
6.5.4.2.1 Стандартная неопределенность эталонного материала 71
6.5.4.2.2 Определение пределов валидности мерного эталонного материала 71
7. ОЦЕНКА НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ …..... 72
7.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМИНА 72
7.2 СПРАВОЧНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ 73
7.3 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 73
7.4 МЕТОДОЛОГИЯ 74

7.4.1 Определение мезюранда и описание метода количественного анализа .74
7.4.2 Критический анализ процесса измерения 75
7.4.3 Расчеты оценки стандартной неопределенности (внутрилабораторный подход 75
7.4.3.1 Сущность метода 75
7.4.3.2 Расчет стандартного отклонения внутрилабораторной воспроизводимости ... 78
7.4.3.3 Оценка типичных источников систематических ошибок, не учтенных в условиях воспроизводимости 79
7.4.3.3.1 Ошибка тарировка (или ошибка калибровки) 79
7.4.3.3.1.1 Процедура 79
7.4.3.3.1.2 Расчеты и результаты 80
7.4.3.3.1.3 Оценка стандартной неопределенности, связанной с прямой тарировки (или прямой калибровки) 81
7.4.3.3.2 Ошибка смещения 82
7.4.3.3.2.1 Методы, скорректированные с использованием только одного сертифицированного эталонного материала ……..... 82
7.4.3.3.2.2 Методы, скорректированные с использованием нескольких эталонных материалов (диапазон тарировки и т.д.) ……..…..82
7.4.3.3.3 Матричный эффект 83
7.4.3.3.3.1 Определение термина 83
7.4.3.3.4 Эффект пробы 86
7.4.4 Оценка стандартной неопределенности при межлабораторных испытаниях ……..…... 86
7.4.4.1 Сущность метода 86
7.4.4.2 Использование стандартного отклонения межлабораторной и внутриметодной воспроизводимости SR_{inter} (метод) 87
7.4.4.3 Использование стандартного отклонения межлабораторной и межметодной воспроизводимости SR_{inter} 87
7.4.4.4 Прочие составляющие в бюджете неопределенности 88
7.5 ВЫРАЖЕНИЕ РАСШИРЕННОЙ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ 88

1. Цель

Цель данного руководства - содействовать энологическим лабораториям, проводящим серийный анализ в рамках валидации, внутреннего контроля качества и оценки неопределенности используемых ими стандартных методов.

2. Преамбула и область применения

Международный стандарт ISO 17025, устанавливающий "Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий", гласит, что аккредитованные лаборатории должны при внедрении альтернативного аналитического метода убедиться в качестве получаемых результатов. В этом контексте в документе прописан ряд шагов. Первый шаг заключается в том, чтобы обозначить требования клиентов в отношении рассматриваемого параметра, чтобы затем определить, соотносится ли используемый метод с этими требованиями. Второй этап включает в себя первичную валидацию нестандартизированных, измененных или разработанных самой лабораторией методов. После применения метода лаборатории должны проверить качество полученных результатов средствами контроля и прослеживаемости. Наконец, они должны оценить неопределенность для полученных результатов.

Для выполнения этих требований в распоряжении лабораторий имеется обширная справочная система, включающая в себя большое число международных руководств и стандартов. Однако на практике применение таких документов сопряжено с трудностями: поскольку они затрагивают все категории калибровочных и испытательных лабораторий, то носят общий характер и предполагают, что читатель обладает глубокими знаниями о математических правилах, применимых к статистической обработке данных.

Опираясь на эту международную справочную систему, настоящее руководство учитывает специфические особенности энологических лабораторий, которые регулярно анализируют серии проб сусла или вина. Определившись с областью применения, стало возможным отобрать подходящие инструменты и оставить только те методы, которые наиболее других подходят для этой сферы. Поскольку настоящее руководство опирается на международную справочную систему, оно находится в строгом с ней соответствии. Однако читатели, желающие более детально изучить некоторые пункты руководства, могут сделать это, обратившись к международным стандартам и руководствам, ссылки на которые приведены в каждой главе.

Авторы решили объединить различные инструменты, отвечающие требованиям стандарта ISO 17025, поскольку существует очевидный разрыв преемственности в их применении, а данные, полученные с помощью одних инструментов, часто могут быть использованы для других. Кроме того, используемые математические средства часто схожи.

Во многих главах даны примеры применения, взятые из энологических лабораторий, где используют эти инструменты.

Важно отметить, что данное руководство не претендует на исчерпывающую полноту. Оно призвано лишь представить в максимально понятной и практичной форме содержание требований стандарта ISO 17025 и основные ресурсы, которыми может воспользоваться обычная лаборатория для их выполнения. Каждая лаборатория вправе дополнять эти средства или заменять их на более эффективные и, по ее мнению, подходящие.

Наконец, следует обратить внимание читателя на то, что представленные инструменты не являются самоцелью и что их использование, а также интерпретация результатов, к которым они приводят, всегда должны подвергаться критическому анализу. Только при этих условиях можно гарантировать их актуальность, а лаборатории смогут использовать их в качестве инструментов для повышения качества проводимых ими анализов.

3. Словарь общих терминов

В настоящем документе используются указанные ниже определения, они заимствованы из нормативных источников, приведенных в библиографии.

Аналит

Объект метода анализа.

Холостое испытание

Испытание, проводимое в отсутствие матрицы (реагентное холостое испытание) или на матрице, которая не содержит аналита (матричное холостое испытание).

Смещение

Разность между ожидаемыми результатами испытания и принятым эталонным значением.

Бюджет неопределенности

Список источников неопределенности и связанных с ними стандартных неопределенностей, составленный для оценки стандартной неопределенности, связанной с результатом измерения.

Тарировка (измерительного прибора)
Материальная установка каждой реперной метки (или только определенных главных реперных меток) измерительного прибора сообразно соответствующему значению измеряемой величины.
ПРИМЕЧАНИЕ: не следует путать термины "тарировка" и "калибровка".

Условия повторяемости
Условия, при которых независимые результаты испытаний получены одним и тем же методом на идентичных испытуемых объектах в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в течение коротких промежутков времени.

Условия воспроизводимости (внутрилабораторные)
Условия, при которых независимые результаты испытаний получены одним и тем же методом на идентичных испытуемых объектах в одной и той же лаборатории одним и тем же или разными оператором (операторами) с использованием разных измерительных приборов в разные дни.

Экспериментальное стандартное отклонение
Для серии из n измерений одного и того же измеряемого вещества величина s характеризует дисперсию результатов и определяется по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(\overline{x_1} - \bar{x})^2}{n-1}}$$

x_i - результат $i^{\text{-го}}$ измерения, а $\bar{x}$ - среднее арифметическое из n рассматриваемых результатов.

Стандартное отклонение повторяемости
Стандартное отклонение множества повторений, полученных в одной лаборатории одним и тем же оператором на одном и том же приборе, т.е. в повторяемых условиях.

Стандартное отклонение внутренней воспроизводимости (или общая внутрилабораторная изменчивость)
Стандартное отклонение повторений, полученных в одной лаборатории с помощью одного и того же метода у нескольких операторов или на нескольких приборах, в частности, путем проведения измерений в разные дни, т.е. в условиях воспроизводимости.

Случайная ошибка
Результат измерения за вычетом среднего значения, которое получилось бы при бесконечном числе измерений одной и той же измеряемой величины, выполненных в условиях воспроизведения.

Ошибка измерения

Результат измерения за вычетом истинного значения мезюранда.

Систематическая ошибка
Средняя ошибка, которая может возникнуть в результате бесконечного числа измерений одного и того же мезюранда, выполненных в условиях воспроизводимости, за вычетом истинного значения мезюранда.

ПРИМЕЧАНИЕ: Ошибка является сугубо теоретическим понятием, поскольку она обращается к недоступным на практике величинам, в частности, к истинным значениям мезюрандов. В принципе, ошибка неизвестна.

Математическое ожидание
Для серии из ***n*** измерений одного и того же мезюранда, если ***n*** стремится к бесконечности, среднее $\bar{x}$ стремится к ожиданию ***E(x)***.

$$E(x) = n \xrightarrow{\lim} \infty \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

Калибровка
Серия операций, устанавливающих при определенных условиях связь между значениями величины, показанными измерительным прибором или системой, или значениями, представленными материализованным измерением или эталонным материалом, и соответствующими значениями величины, измеренными по стандартам.

Внутрилабораторная оценка аналитического метода
Действие, когда аналитический метод подвергается внутрилабораторному статистическому исследованию, опирающемуся на стандартизованный и/или утвержденный протокол и демонстрирующему, что метод в своей области применения соответствует установленным критериям эффективности.
В рамках настоящего документа оценка метода основана на внутрилабораторном исследовании, которое включает в себя сравнение с эталонным методом.

Прецизионность
Степень близости друг к другу независимых результатов испытаний, полученных при заранее заданных условиях.
ПРИМЕЧАНИЕ 1: Прецизионность зависит только от распределения случайных ошибок и не связана с истинным или заданным значением.
ПРИМЕЧАНИЕ 2: Измерение прецизионности выражается на основе стандартного отклонения результатов испытаний.
ПРИМЕЧАНИЕ 3: Выражение "независимые результаты испытаний" обозначает результаты, полученные методом, который не зависит от

предыдущего результата по тому же или подобному испытуемому материалу. Количественные измерения прецизионности в значительной степени зависят от предписанных условий. Условия повторяемости и воспроизводимости - это конкретные группы экстремальных условий.

Величина (измеряемая)

Характеристика явления, тела или вещества, которая может быть выделена качественно и определена количественно.

Неопределенность измерения

Параметр, связанный с результатом измерения, который характеризует дисперсию значений, которые могут быть обоснованно отнесены к измеряемой величине.

Стандартная неопределенность (*u(xi)*)

Неопределенность результата измерения, выраженная в виде стандартного отклонения.

Точность

Степень близости между средним значением, полученным на основе широкой серии результатов испытаний, и принятым эталонным значением.

ПРИМЕЧАНИЕ Измерение точности обычно выражается в контексте смещения.

Предел обнаружения

Наименьшее количество исследуемого аналита в испытуемом материале, которое может быть обнаружено и рассматривается как отличное от холостого значения (с заданной вероятностью), но не обязательно в количественном выражении. Фактически, необходимо учитывать два риска:

- риск α счесть, что вещество присутствует в испытуемом материале, когда его количество равно нулю;
- риск β счесть, что вещество отсутствует в материале, когда его количество не равно нулю.

Предел квантификации

Наименьшее количество исследуемого аналита в испытуемом материале, которое может быть количественно определено в экспериментальных условиях, описанных в методе, с заданной вариабельностью (заданным коэффициентом изменения).

Линейность

Способность аналитического метода в определенном диапазоне выдавать информативное значение или результаты или результаты, пропорциональные качеству определяемого аналита в лабораторной пробе.

Эта пропорциональность выражается априорно определенным математическим выражением.

Пределы линейности - экспериментальные пределы концентраций, между которыми можно применить линейную калибровочную модель с известным уровнем доверия (обычно принимается равным 1%).

Испытуемый материал

Материал или вещество, по которому можно произвести измерение с помощью рассматриваемого аналитического метода.

Эталонный материал

Материал или вещество, одно или несколько значений свойств которого настолько однородно и качественно установлены, что его можно использовать для калибровки прибора, оценки метода измерения или для присвоения значений материалам.

Сертифицированный эталонный материал

Сопровождаемый сертификатом эталонный материал, одно или несколько значений свойств которого сертифицированы в ходе процедуры по установлению его прослеживаемости до точной реализации единицы, в которой выражены значения свойств, и для которого каждое сертифицированное значение сопровождается неопределенностью на установленном уровне доверия.

Матрица

Все составляющие испытуемого материала, кроме аналита.

Аналитический метод

Записанный порядок действий, описывающий все средства и процедуры, необходимые для проведения анализа аналита, а именно.: область применения, принцип и/или реакции, определения, реагенты, аппаратура, процедуры, выражение результатов, точность, протокол испытаний.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Выражения "метод титрования" и "метод определения" иногда используются как синонимы выражения "аналитический метод ". Не следует использовать эти два выражения таким образом.

Метод количественного анализа

Аналитический метод, позволяющий измерить количество аналита, присутствующего в материале лабораторного испытания.

Эталонный аналитический метод (методы типа I или типа II) Метод, который дает принятое эталонное значение для количества аналита, подлежащего измерению.

Неклассифицированный альтернативный аналитический метод
Обычный аналитический метод, используемый лабораторией и не рассматриваемый как эталонный.

ПРИМЕЧАНИЕ Альтернативный аналитический метод может сводиться к упрощенному варианту эталонного метода.

Измерение
Набор действий с целью определить значение величины.
ПРИМЕЧАНИЕ: Операции могут выполняться автоматически.

Измеримая величина
Конкретная величина, подлежащая измерению.

Среднее значение
Среднее значение для серии из ***n*** измерений одного и того же мезюранда, определяемое по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

x_i – результат ***i-ого*** измерения.

Результат измерения
Полученное в результате измерения значение, которое присваивается мезюранду.

Чувствительность
Соотношение между изменением ценности информации аналитического метода и изменением количества аналита.
Количество аналита обычно изменяется при приготовлении различных стандартных растворов или при добавлении аналита в матрицу.
ПРИМЕЧАНИЕ 1: В более широком смысле следует избегать определения чувствительности метода через его способность обнаруживать малые количества.
ПРИМЕЧАНИЕ 2: Метод считается "чувствительным", если незначительное изменение величины или количества аналита приводит к значительному изменению значения информации.

Измерительный сигнал
Величина, которую представляет мезюранд и функционально связанная с ним.

Специфичность
Свойство аналитического метода реагировать исключительно на определение количества рассматриваемого аналита с гарантией того, что измеряемый

сигнал исходит только от аналита.

Предел

Отклонение от эталонного значения, определенное лабораторией для конкретного уровня, в пределах которого может быть принято измеренное значение эталонного материала.

Значение величины

Количественное выражение конкретной величины обычно в виде единицы измерения, умноженной на число.

Истинное значение величины

Значение, совместимое с определением данной конкретной величины.

ПРИМЕЧАНИЕ 1: Значение, которое было бы получено при идеальном измерении.

ПРИМЕЧАНИЕ 2: Любое истинное значение по своей природе является неопределенным.

Принятое эталонное значение

Значение, которое служит в качестве согласованного эталона для сравнения и которое получено как:

a) теоретическое или установленное значение, основанное на научных принципах;

b) заданное или сертифицированное значение, основанное на экспериментальной работе какой-либо национальной или международной организации;

c) консенсусное или сертифицированное значение, основанное на совместной экспериментальной деятельности под эгидой научной или инженерной группы.

В данном документе принятое эталонное значение (или условно истинное значение) испытуемого материала определяется как среднее арифметическое значений измерений, повторенных в соответствии с эталонным методом.

Дисперсия

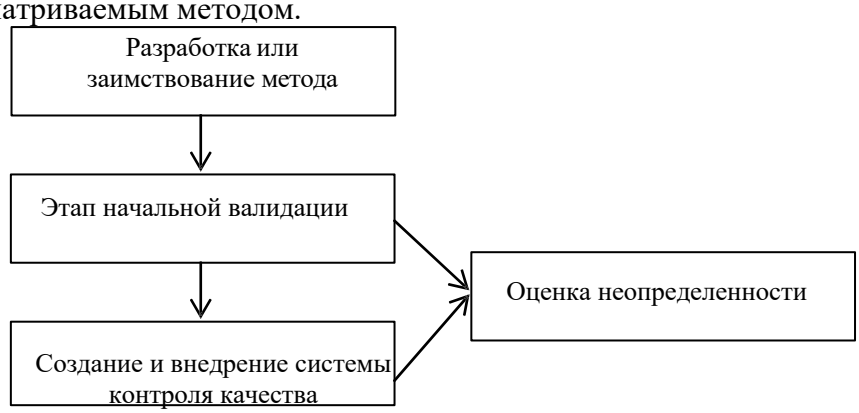
Квадрат стандартного отклонения.

4. Общие принципы

4.1 Методология

При разработке нового альтернативного метода лаборатория реализует протокол, состоящий из нескольких этапов. Первый этап, реализуемый единожды вначале или регулярно - валидация метода. Далее следует постоянный контроль качества. Все данные, собранные в ходе этих двух этапов, позволяют оценить качество метода.

Данные, собранные на этих двух этапах, используются для оценки неопределенности измерений. Последняя оценивается регулярно, являясь показателем качества результатов, полученных рассматриваемым методом.



Все эти шаги взаимосвязаны и образуют комплексный подход, который можно использовать для оценки и контроля ошибок измерения.

4.2 Определение ошибок измерения

Любое измерение, выполненное с использованием исследуемого метода, дает результат, который неизбежно связан с ошибкой измерения, определяемой как разница между полученным результатом и истинным значением мезюранда. На практике **истинное значение измеряемой вечины труднодоступно**, и вместо него используется значение, условно принятое за таковое.

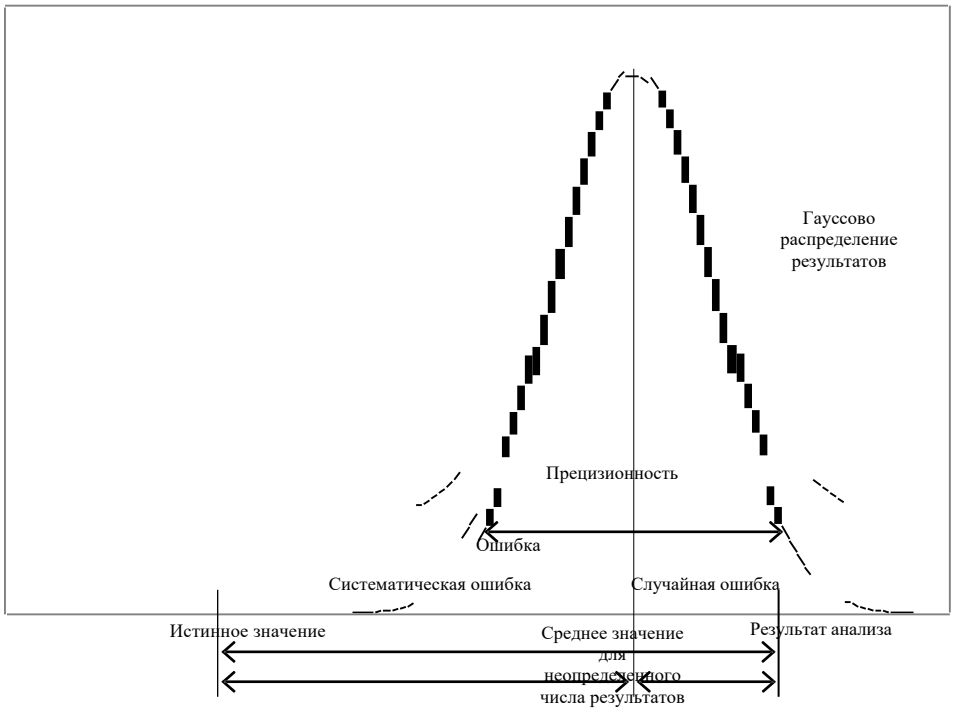
Ошибка измерения состоит из двух компонентов:

Ошибка измерения

Истинное значение = результат анализа + систематическая ошибка + случайная ошибка

Систематическая ошибка приводит на практике к смещению относительно истинного значения, а случайная ошибка - это совокупность ошибок, связанных с применением метода.

Графически эти ошибки можно представить следующим образом:



Для оценки систематических и случайных ошибок, а также для наблюдения за их изменениями с течением времени используют средства валидации и контроля качества.

5. Валидация метода

5.1 Методология

Проведение валидации включает в себя три этапа, каждый из которых имеет свои цели. Лаборатория располагает инструментами валидации для достижения каждой из них. Для какой-то цели может быть предусмотрено множество инструментов, они же подходят для различных ситуаций. Правильный выбор наиболее подходящих инструментов для метода, требующего валидации, возложен на саму лабораторию.

Этапы	**Цели**	**Инструменты валидации**
Область применения		
	- Определить анализируемые матрицы	
	- Определить анализируемый диапазон	Предел обнаружения и количественного определения Исследование устойчивости
Систематич. ошибка		
или смещение	- Линейная реакция в масштабе анализируемых значений	Исследование линейности
	- Специфичность метода	Исследование специфичности
	- Точность метода	Сравнение с эталонным методом Сравнение с эталонными материалами Межлабораторное сравнение
Случайная ошибка	- Прецизионность метода	Исследование повторяемости Межлабораторное исследование воспроизводимости

5.2 Раздел первый: область применения метода

5.2.1 ***Определение анализируемых матриц***

Матрица включает в себя все составляющие испытуемого материала, кроме аналита. Если эти составляющие могут повлиять на результат измерения, лаборатория должна определить матрицы, к которым применим метод.

Например, в энологии на определение ряда параметров могут влиять всевозможные матрицы (вина, сусла, сладкие вина и т.д.).

В случае сомнений относительно влияния матрицы можно при изучении специфичности провести более глубокие исследования.

5.2.2 ***Предел обнаружения и количественного определения***

Этот этап, конечно, не относится и не является необходимым для тех методов, нижний предел которых не стремится к 0, например, доля этанола по объему в винах, общая кислотность в винах, pH и т.д.

5.2.2.1 Нормативное определение

Предел обнаружения - это наименьшее количество аналита, которое может быть обнаружено, но не обязательно выражено количественно в виде точного значения. Предел обнаружения - это параметр для анализа на предельное содержание.

Предел количественного определения - это наименьшее количество соединения, которое может быть определено с помощью метода.

5.2.2.2 Справочная документация

- Стандарт NF V03-110, процедура внутрилабораторной валидации альтернативного метода в привязке к эталонному методу.
- Международный сборник аналитических методов - МОВВ, Оценка пределов обнаружения и количественного определения для аналитического метода (Резолюция Oeno 7/2000).

5.2.2.3 Способ применения

На практике предел количественного определения обычно более значим, чем предел обнаружения, причем последний, по общему правилу, составляет 1/3 от первого.

Существует несколько подходов к оценке пределов обнаружения и количественного определения:

- определение на холостой пробе;
- подход с исследованием линейности;
- подход с построением графика.

Указанные методы подходят для различных ситуаций, но в каждом случае эти математические подходы дают результаты, которые имеют лишь информативное значение. Представляется крайне важным, вводить по возможности проверку полученного значения, будь то с помощью одного из этих подходов или через эмпирическую оценку, используя при этом протокол проверки для заранее определенного предела количественного определения.

5.2.2.4 Проведение исследования

5.2.2.4.1 Определение на холостой пробе

5.2.2.4.1.1 Область применения

Этот метод можно применять, когда анализ холостых проб дает результаты с ненулевым стандартным отклонением. Решение о целесообразности использования холостых реагентов или матриц принимает оператор.

Если по причинам, связанным с неконтролируемой предварительной обработкой сигнала, холостая проба не поддается измерению или не дает регистрируемого изменения (стандартное отклонение равно 0), манипуляцию можно проводить при очень низкой концентрации аналита, близкой к холостой.

5.2.2.4.1.2 Стандартный протокол и расчет

Проводят анализ ***n*** испытуемых материалов, приравненных к холостым пробам, при этом ***n*** должно быть равно или больше 10.

- Вычисляют среднее значение для полученных результатов x_i:

$$\bar{x}_{\text{холостой}} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_1}{n}$$

- Вычисляют стандартное отклонение для полученных результатов x_i:

$$s_{\text{холостой}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x}_{\text{холостой}})^2}{n-1}}$$

- На основании этих результатов условно определяют предел обнаружения по формуле:

$$L_{\text{холостой}} = \bar{x}_{\text{холостой}} + (3.S_{\text{холостой}})$$

- На основании этих результатов условно определяют предел количественного определения по формуле:

$$L_{\text{холостой}} = \bar{x}_{\text{холостой}} + (10.S_{\text{холостой}})$$

Пример: *В таблице ниже приведены некоторые результаты, полученные при оценке предела обнаружения в ходе обычного определения свободного диоксида серы.*

Испытуемый материал №	***X (мг/л)***
1	*0*
2	*1*
3	*0*
4	*1,5*
5	*0*
6	*1*
7	*0,5*
8	*0*
9	*0*
10	*0,5*
11	*0*
12	*0*

Расчетные значения:

$$\boldsymbol{q} = 12$$

$$\boldsymbol{M}_{\textit{холостой}} = 0{,}375$$

$$\boldsymbol{S}_{\textit{холостой}} = 0{,}528 \text{ мг/л}$$

$$\boldsymbol{DL} = 1{,}96 \text{ мг/л}$$

$$\boldsymbol{QL} = 5{,}65 \text{ мг/л}$$

5.2.2.4.2 Подход с исследованием линейности

5.2.2.4.2.1 Область применения

Данный метод может применяться во всех случаях. Он необходим, когда аналитический метод не предполагает фонового шума. Для него используют данные, рассчитанные при исследовании линейности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Данный статистический подход может иметь смещение и давать пессимистические результаты, когда линейность рассчитывается по очень широкому диапазону значений для эталонных материалов, и результаты измерений которых включают переменные стандартные отклонения. В таких случаях более релевантную оценку позволит получить исследование линейности, ограниченное диапазоном низких значений, близких к 0 и с более однородным распределением

5.2.2.4.2.2 Стандартный протокол и расчет

Используют полученные при исследовании линейности результаты, которые позволили рассчитать параметры калибровочной функции $y = a + b.x$

Данные, которые должны быть получены в результате исследования линейности (см. главу 5.3.1. Исследование линейности):

- наклон прямой регрессии:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)^2}$$

- остаточное стандартное отклонение: $S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{i,j} - \hat{y}_{i,j})^2}{pn-2}}$

- стандартное отклонение в точке пересечения (должно быть рассчитано): $S_a = S_{res}\sqrt{\left(\frac{1}{np} + \frac{M_x^{\,2}}{\sum_{i=1}^{n}p(x_i - M_x)^2}\right)}$

Оценки предела обнаружения DL и предела количественного определения QL рассчитываются по следующим формулам:

$DL = \frac{3 \times S_a}{b}$ Предполагаемый предел обнаружения

$QL = \frac{10 \times S_a}{b}$ Предполагаемый предел количественного определения

Пример: Оценка пределов обнаружения и количественного определения сорбиновой кислоты методом капиллярного электрофореза на основе данных о линейности, полученных в диапазоне от 1 до 20 *мг/л*$^{-1}$.

X (ref)	Y1	Y2	Y3	Y4
1	*1.9*	*0.8*	*0.5*	*1.5*
2	*2.4*	*2*	*2.5*	*2.1*
3	*4*	*2.8*	*3.5*	*4*
4	*5.3*	*4.5*	*4.7*	*4.5*
5	*5.3*	*5.3*	*5.2*	*5.3*
10	*11.6*	*10.88*	*12.1*	*10.5*
15	*16*	*15.2*	*15.5*	*16.1*
20	*19.7*	*20.4*	*19.5*	*20.1*

Число эталонных материалов $n = 8$
Число повторов $p = 4$
Прямая (y = a + b*x)
$b = 0.9972$ $a = 0.51102$
Остаточное стандартное отклонение:
$S_{res} = 0.588$
Стандартное отклонение в точке пересечения
$\boldsymbol{S_a} = 0.1597$

Предполагаемый предел обнаружения $DL = 0{,}48$ *мг/л*$^{-1}$
Предполагаемый предел количественного определения $QL = 1{,}6$ *мг/л*$^{-1}$

5.2.2.4.3 Подход с построением графика на основе фонового шума записи

5.2.2.4.3.1 *Область применения*

Данный подход может применяться к аналитическим методам, которые предусматривают графическую запись (хроматография и т.д.) с фоновым шумом. Пределы оцениваются на основе изучения фонового шума.

5.2.2.4.3.2 *Стандартный протокол и расчет*
Записывают некоторое количество холостых реактивов, используя три серии по три ввода с перерывом в несколько дней.
Определяют следующие значения:

- h_{max} - наибольшее изменение амплитуды сигнала по оси *y*, наблюдаемое между двумя точками сбора данных, исключая дрейф, на расстоянии, равном двадцатикратной ширине на средней высоте пика, соответствующего аналиту, с центром над временем удерживания исследуемого соединения.
- R - коэффициент отклика количества/сигнала, выраженный в высоте.

Предел обнаружения **DL** и предел количественного определения **QL** рассчитывают по следующим формулам:

$$DL = 3\ h_{max}\ R \qquad QL = 10\ h_{max}\ R$$

5.2.2.4.4 Проверка предопределенного предела количественного определения
Данный подход может быть использован для подтверждения значения количественного определения, полученного статистическим или эмпирическим методом.

5.2.2.4.4.1 *Область применения*
Данный метод может быть использован для проверки того, что заданный предел количественного определения является априори допустимым. Он применим в случае, когда лаборатория может получить не менее 10 испытуемых материалов с известным количеством аналита на уровне предполагаемого предела количественного определения.
При методах со специфическим сигналом, не чувствительных к матричным эффектам, материалами могут выступать синтетические растворы, эталонное значение которых получено путем составления рецептуры.

Во всех остальных случаях используются вина (или сусла), значение измеряемой величины которых, полученное эталонным методом, равно исследуемому пределу. Разумеется, в этом случае предел количественного определения эталонного метода должен быть ниже этого значения.

5.2.2.4.4.2 *Основной протокол и расчет*

Анализируют ***n*** независимых испытуемых материалов, принятое значение которых равно проверяемому пределу количественного определения; ***n*** должно быть, по крайней мере, равно 10.

- Вычисляют среднее значение ***n*** измерений:

$$\bar{x}_{LQ} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

- Вычисляют стандартное отклонение ***n*** измерений:

$$S_{LQ} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x}_{LQ})^2}{n-1}}$$

с x_i результатами измерения $i^{-го}$ испытуемого материала.

Необходимо выполнить два следующих условия:

a) измеренное среднее количество $\bar{x}_{LQ}$ не должно отличаться от предварительно определенного предела количественного определения *QL*:

Если $\frac{|QL - \bar{x}_{QL}|}{\frac{S_{QL}}{\sqrt{n}}}$ < 10, то предел количественного определения *QL* считается валидным.

ПРИМЕЧАНИЕ: 10 — это чисто условное значение, относящееся к критерию *QL*.

b) предел количественного определения должен быть больше 0:

Если 5 s_{QL} < *QL*, то предел количественного определения отличен от 0.

Значение 5 соответствует приблизительному значению разброса стандартного отклонения, с учетом риска α и риска β для того, чтобы *QL* был отличен от 0.

Это равносильно проверке того, что коэффициент изменения для *QL* меньше, чем 20%.
ПРИМЕЧАНИЕ 1: Следует помнить, что предел обнаружения получают при делении предела количественного определения на 3.
ПРИМЕЧАНИЕ 2: Следует убедиться, что значение S_{LQ} не слишком велико (что привело бы к искусственно положительному тесту) и соответствует разумному стандартному отклонению изменчивости результатов для рассматриваемого уровня. Лаборатория сама должна провести эту критическую оценку значения S_{LQ}.

Пример: Проверка предела количественного определения яблочной кислоты ферментным методом.

Предполагаемый предел количественного определения: 0,1 г/л$^{-1}$

Вино	Значения
1	*0.1*
2	*0.1*
3	*0.09*
4	*0.1*
5	*0.09*
6	*0.08*
7	*0.08*
8	*0.09*
9	*0.09*
10	*0.08*

Среднее: *0.090*
Стандартное отклонение: *0.008*

Первое условие: $\frac{\left|LQ-\bar{x}_{QL}\right|}{\frac{S_{QL}}{\sqrt{n}}}=3.87<10$

Предел количественного определения 0,1 считается валидным.

Второе условие: $5.S_{LQ} = 0.04 < 0.1$ Предел количественного определения считается значительно отличающимся от 0.

5.2.3 ***Устойчивость***

5.2.3.1 *Определение термина*
Устойчивость - способность метода давать близкие результаты при незначительных изменениях экспериментальных условий, которые могут произойти в ходе процедуры.

5.2.3.2 ***Определение***
Если существуют сомнения относительно влияния изменений рабочих параметров, лаборатория может прибегнуть к научному применению графиков экспериментов, позволяющих проверить эти критические рабочие параметры в диапазоне изменений, которые могут произойти на практике. Подобные испытания на практике труднореализуемы.

5.3 **Раздел второй: изучение систематической ошибки**
5.3.1 ***Исследование линейности***
5.3.1.1 ***Нормативное определение***
Линейность — это способность метода (в заданном диапазоне) выдавать информативное значение или результаты, пропорциональные количеству определяемого аналита в испытуемом материале.

5.3.1.2 ***Справочная документация***

- Стандарт NF V03-110, процедура внутрилабораторной валидации альтернативного метода в привязке к эталонному методу
- Стандарт ISO 11095, линейная калибровка с использованием эталонных материалов.
- Стандарт ISO 8466-1, качество воды - калибровка и оценка аналитических методов, оценка рабочих характеристик.

5.3.1.3 Применение
Исследование линейности может быть использовано для определения и валидации линейного динамического диапазона.

Подобное исследование возможно, когда лаборатория располагает стабильными эталонными материалами, признанные значения которых получены с определенностью (теоретически эти значения должны иметь неопределенность, равную 0).

Это могут быть внутренние эталонные материалы, титрованные калиброванным материалом, вина или сусла, значение которых определяется средним значением при не менее 3 повторениях эталонного метода, внешние эталонные материалы или сертифицированные внешние эталонные материалы.
Исключительно в последнем случае данное исследование также позволяет получить прослеживаемость метода. Тогда используемый здесь график эксперимента можно рассматривать как калибровку.
Во всех случаях рекомендуется убедиться, что матрица эталонного материала совместима с методом.

Наконец, расчеты должны проводиться с конечным результатом измерения, а не с величиной сигнала.

Здесь предлагаются два подхода:

- Подход типа ISO 11095, принцип которого заключается в сравнении остаточной ошибки с экспериментальной ошибкой при помощи теста Фишера. Этот подход валиден прежде всего для относительно узких диапазонов (в которых мезюранд не изменяется более чем в 10 раз). Кроме того, в экспериментальных условиях, выдающих низкую ошибку воспроизводимости, тест становится чрезмерно жестким. С другой стороны, в случае плохих экспериментальных условий тест легко станет положительным, а также потеряет свою целесообразность. Для данного подхода требуется хорошая однородность числа измерений во всем исследуемом диапазоне.

- Подход типа ISO 8466, принцип которого заключается в сравнении остаточной ошибки, вызванной линейной регрессией, с остаточной ошибкой, полученной при полиномиальной регрессии (например, порядка 2), примененной к тем же данным. Если полиномиальная модель выдает значительно меньшую остаточную ошибку, можно сделать вывод о нелинейности. Такой подход уместен, в частности, когда существует риск высокой экспериментальной дисперсии на одном конце диапазона. Следовательно он естественным образом хорошо подходит для методов анализа следов. Нет необходимости работать с однородным количеством измерений по всему диапазону, и даже рекомендуется увеличить количество измерений на границах диапазона.

5.3.1.4 ***Подход типа ISO 11095***

5.3.1.4.1 Стандартный протокол

Рекомендуется использовать определенное число ***n*** стандартных материалов. Это число должно быть больше 3, однако нет необходимости превышать 10.

Эталонные материалы измеряют ***p*** раз ***в условиях воспроизводимости***, ***p*** должно быть больше 3, обычно рекомендуется 5. Принятые значения для эталонных материалов регулярно распределяют по исследуемому диапазону значений. Количество измерений должно быть одинаковым для всех эталонных материалов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Необходимо, чтобы условия воспроизводимости задействовали максимум потенциальных источников изменчивости, при этом существует риск, что испытание проявит нелинейность в чрезмерной степени.

Результаты указывают в таблице в следующем виде:

Эталонные материалы	**Принятое эталон. значение материала**	**Измеренные значения**				
		Повтор 1	**...**	**Повтор j**	**...**	**Повтор p**
1	x_1	y_{11}	...	y_{1j}	...	y_{1p}
...	...	...	...	...	...	...
i	x_i	y_{i1}	...	y_{ij}	...	y_{ip}
...	...	...	...	...	...	...
n	x_n	y_{n1}	...	y_{nj}	...	y_{np}

5.3.1.4.2 Расчеты и результаты

5.3.1.4.2.1 Определение модели регрессии

Модель рассчитывается и тестируется следующим образом:

$$y_{ij} = a + b.x_i + \varepsilon_{ij}$$

где

y_{ij} j-ый повтор $i^{-ого}$ эталонного материала

x_i принятое значение $i^{-ого}$ эталонного материала

b наклон прямой регрессии

a точка пересечения прямой регрессии

$a+b.x_i$ представляет собой ожидание значения измерения $i^{-ого}$ эталонного материала

ε_{ij} разница между y_{ij} и ожидаемым значением измерения $i^{-ого}$ эталонного материала

5.3.1.4.2.2 *Оценка параметров*

Параметры прямой регрессии получают по следующим формулам:

- среднее значение ***p*** измерений ***i-ого*** эталонного материала $yi = \frac{1}{p}\sum_{j=1}^{p} y_{ij}$
- среднее значение всех принятых значений *n* эталонных материалов $M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$
- среднее значение всех измерений $My = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i$
- расчётный наклон ***b*** $b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)^2}$
- расчетная точка пересечения ***a*** $a = M_y - b \times M_x$
- значение регрессии, связанное с ***i-ым*** эталонным материалом $\hat{y}_i$

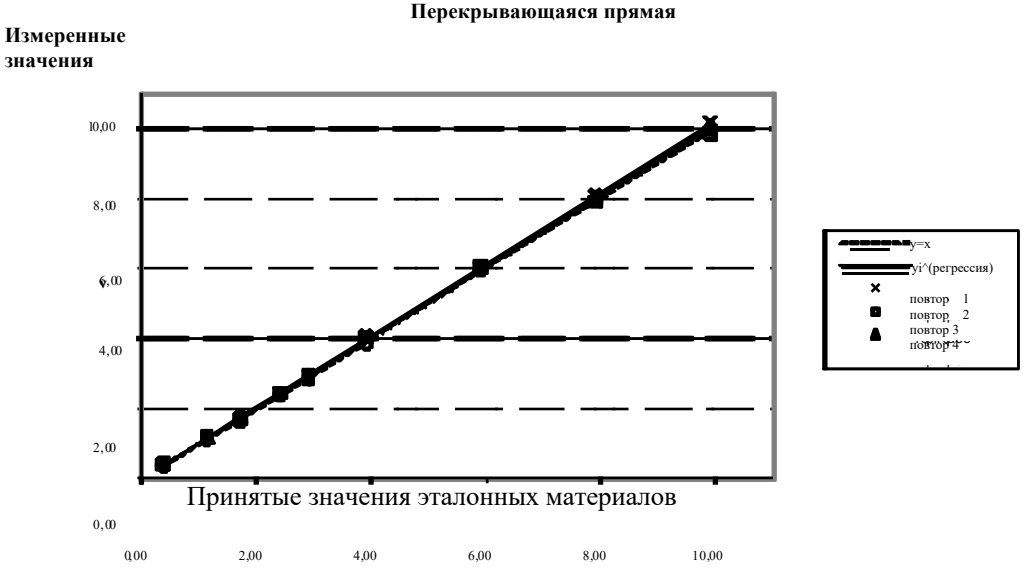
$$\hat{y}_i = a + b \times x_i$$

- остаток $\mathbf{e}_{ij}$ $e_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_i$

5.3.1.4.2.3 *Графики*

Результаты могут быть представлены и проанализированы в графической форме. Используют два типа графиков.

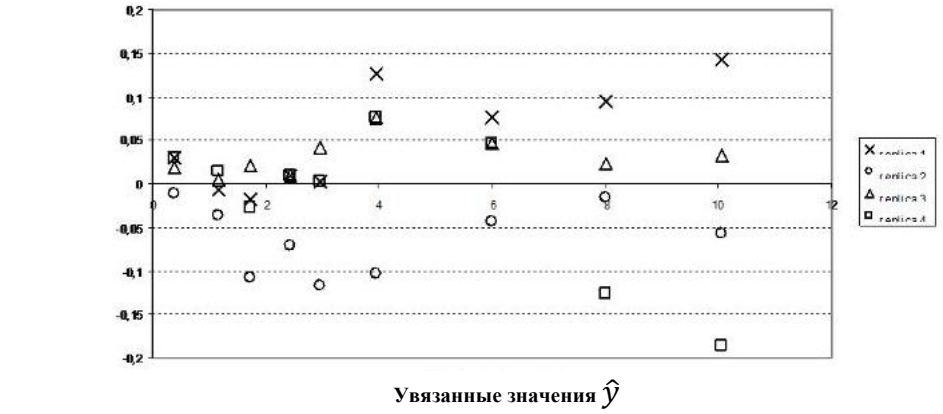
- На графике первого типа показаны измеренные значения в сравнении с принятыми значениями эталонных материалов. Также откладывают расчетную перекрывающуюся прямую.



- На втором графике представлены остаточные значения в сравнении с расчетными значениями эталонных материалов ($\hat{y}$), обозначенных перекрывающейся прямой.

Данный график является хорошим показателем отклонения по отношению к предположению о линейности: линейный динамический диапазон валиден, если остаточные значения справедливо распределены между положительными и отрицательными значениями.

Остаточные значения в сравнении с увязанными значениями: пример исследования линейности



В случае сомнений в линейности регрессии можно провести тест Фишера-Снедекора и проверить предположение: "линейный динамический диапазон не валиден", в дополнение к графическому анализу.

5.3.1.4.2.4 Проверка предположения о линейности

Прежде всего, необходимо определить несколько значений ошибки, связанных с калибровкой: они могут быть оценены с помощью данных, собранных в ходе эксперимента. Затем на основе этих результатов проводят статистическую проверку предположения о невалидности линейного динамического диапазона: это тест Фишера-Снедекора.

5.3.1.4.2.4.1 Определения ошибок, связанных с калибровкой
Эти ошибки даются в виде стандартного отклонения, полученного из квадратного корня отношения суммы квадратов к степени свободы.

Остаточная ошибка
Остаточная ошибка соответствует ошибке между измеренными значениями и значением, заданным прямой регрессии.

Сумма квадратов остаточной ошибки: $$Q_{res} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2$$

Число степеней свободы равно *np-2*.

Остаточное стандартное отклонение оценивается по формуле:

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{np-2}}$$

Экспериментальная ошибка

Экспериментальная ошибка соответствует стандартному отклонению воспроизводимости эксперимента.

Сумму квадратов экспериментальной ошибки находят следующим образом:

$$Q_{\exp} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2$$

Число степеней свободы равно *np-n*.

Экспериментальное стандартное отклонение (воспроизводимость) оценивается по формуле:

$$S_{\exp} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2}{np-n}}$$

ПРИМЕЧАНИЕ: Эту величину иногда также обозначают как S_R.

Ошибка корректировки

Величина ошибки корректировки - это экспериментальная ошибка за вычетом остаточной ошибки.

Сумма квадратов ошибки корректировки равна:

$$Q_{def} = Q_{res} - Q_{\exp}$$

или

$$Q_{def} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2 - \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2$$

Число степеней свободы равно n-2

Стандартное отклонение ошибки корректировки оценивают по формуле:

$$S_{def} = \sqrt{\frac{Q_{res} - Q_{\exp}}{n-2}}$$

или

$$S_{def} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2 - \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2}{n-2}}$$

5.3.1.4.2.4.2 Тест Фишера-Снедекора

Коэффициент $F_{obs} = \frac{S_{def}^{\ 2}}{S_{\exp}^{\ 2}}$ подчиняется закону Фишера-Снедекора

состепенями свободы *n-2, np-n*.

Рассчитанное экспериментальное значение F_{obs} сравнивают с предельным значением: $F_{1-\alpha}$ *(n- 2,np-n)*, взятым из таблицы закона Снедекора. Значение для α, используемое на практике, составляет обычно 5%.

Если $F_{obs} \geq F_{1-\alpha}$, то соглашаются с предположением о невалидности линейного динамического диапазона (*с риском ошибки в 5%).*

Если $F_{obs} < F_{1-\alpha}$, то предположение о невалидности линейного динамического диапазона отвергают.

Пример: Исследование линейности для определения винной кислоты методом капиллярного электрофореза. Используют 9 стандартных материалов. Это синтетические растворы винной кислоты, титрованные с помощью шкалы, прослеживаемой до стандартных масс.

Этал. материал	**Ti (ref)**	**Y1**	**Y2**	**Y3**	**Y4**
1	*0.38*	*0.41*	*0.37*	*0.4*	*0.41*
2	*1.15*	*1.15*	*1.12*	*1.16*	*1.17*
3	*1.72*	*1.72*	*1.63*	*1.76*	*1.71*
4	*2.41*	*2.45*	*2.37*	*2.45*	*2.45*
5	*2.91*	*2.95*	*2.83*	*2.99*	*2.95*
6	*3.91*	*4.09*	*3.86*	*4.04*	*4.04*
7	*5.91*	*6.07*	*5.95*	*6.04*	*6.04*
8	*7.91*	*8.12*	*8.01*	*8.05*	*7.9*
9	*9.91*	*10.2*	*10*	*10.09*	*9.87*

Прямая регрессии

Прямая (y = a + b*x)

b = 1,01565

a = - 0,00798

Ошибки, связанные с калибровкой

Остаточное стандартное отклонение S_{res} = 0,07161

Стандартное отклонение экспериментальной воспроизводимости S_{exp} = 0,07536

Стандартное отклонение ошибки настройки S_{def} = 0,0548

Интерпретация, тест Фишера-Снедекора

$F_{obs} = 0,53 < F_{1-\alpha} = 2,37$

Предположение о невалидности линейного динамического диапазона отвергают.

5.3.1.5 Подход типа ISO 8466

5.3.1.5.1 Стандартный протокол

Рекомендуется использовать определенное число ***n*** эталонных материалов. Это число должно быть больше 3, но нет необходимости превышать 10. Эталонные материалы необходимо измерить несколько раз в **условиях воспроизводимости**. Число измерений может быть небольшим в центре исследуемого диапазона (минимум = 2) и должно быть больше на обоих концах диапазона, обычно рекомендуется минимум 4. Принятые значения эталонных материалов следует регулярно распределять по исследуемому диапазону значений.

ПРИМЕЧАНИЕ: Крайне важно в условиях воспроизводимости использовать максимальное количество потенциальных источников изменчивости.

Результаты указывают в таблице в следующем виде:

Эталонные материалы	**Принятое значение эталонного материала**	**Измеренные значения**				
		Повтор 1	**Повтор 2**	**Повтор j**	**...**	**Повтор p**
1	x_1	y_{11}	y_{12}	y_{1j}	...	y_{1p}
...	...	...	...	...	...	
i	x_i	y_{i1}	y_{i2}			
...	...	...	...	...	...	
N	x_n	y_{n1}	...	y_{nj}	...	y_{np}

5.3.1.5.2 Расчеты и результаты

5.3.1.5.2.1 *Определение модели линейной регрессии*

Модель линейной регрессии вычисляют с помощью расчетов, подробно описанных выше.

Остаточная ошибка стандартного отклонения для линейной модели S_{res} затем может быть рассчитана по формуле, указанной в § 5.3.1.4.2.4.1.

5.3.1.5.2.2 *Определение модели полиномиальной регрессии*

Расчет полиномиальной модели порядка 2 приведен ниже.

Цель - определить параметры модели полиномиальной регрессии порядка 2, применимой к данным из графика эксперимента.

$$y = a\,x^2 + bx + c$$

Цель - определить параметры a, b и c. Это определение, как правило, может быть компьютеризировано с использованием электронных таблиц и статистического программного обеспечения.

Формулы оценки этих параметров выглядят следующим образом:

$$a = \frac{\sum_i x_i^2 y_i \left(N\sum_i x_i^2 - \left[\sum_i xi\right]^2 \right) - \sum_i x_i^3 \left(N\sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i x_i y_i \sum_i x_i - \sum_i y_i \sum_i x_i^2 \right)}{\sum_i x_i^4 \left(N\sum_i x_i^2 - \left[\sum_i xi\right]^2 \right) - \sum_i x_i^3 \left(N\sum_i x_i^3 - \sum_i x_i^2 \sum_i x_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i x_i \sum_i x_i^3 - \left[\sum_i x_i^2\right]^2 \right)}$$

$$b = \frac{\sum_i x_i^4 \left(N\sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i \right) - \sum_i x_i^2 y_i \left(N\sum_i x_i^3 - \sum_i x_i^2 \sum_i x_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i y_i \sum_i x_i^3 - \sum_i x_i y_i \sum_i x_i^2 \right)}{\sum_i x_i^4 \left(N\sum_i x_i^2 - \left[\sum_i xi\right]^2 \right) - \sum_i x_i^3 \left(N\sum_i x_i^3 - \sum_i x_i^2 \sum_i x_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i x_i \sum_i x_i^3 - \left[\sum_i x_i^2\right]^2 \right)}$$

$$c = \frac{\sum_i x_i^4\left(\sum_i x_i^2\sum_i y_i - \sum_i x_i\sum_i x_i y_i\right) - \sum_i x_i^3\left(\sum_i x_i^3\sum_i y_i - \sum_i x_i^2\sum_i x_i y_i\right) + \sum_i x_i^2 y_i\left(\sum_i x_i\sum_i x_i^3 - \left[\sum_i x_i^2\right]^2\right)}{\sum_i x_i^4\left(N\sum_i x_i^2 - \left[\sum_i xi\right]^2\right) - \sum_i x_i^3\left(N\sum_i x_i^3 - \sum_i x_i^2\sum_i x_i\right) + \sum_i x_i^2\left(\sum_i x_i\sum_i x_i^3 - \left[\sum_i x_i^2\right]^2\right)}$$

После создания модели необходимо рассчитать следующие значения:

- значение регрессии, связанное с $i^{-м}$эталонным материалом $\hat{y}'_i$

$$\hat{y}'_i = a\boldsymbol{x}^2 + b\boldsymbol{x} + c$$

- остаточный eij $\quad e'_{ij} = y_{ij} - \hat{y}'_i$

Остаточное стандартное отклонение полиномиальной модели

$$S'_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}'_i)^2}{np-2}}$$

5.3.1.5.2.3 *Сравнение остаточных стандартных отклонений*

Расчет $$DS^2 = (N-2)S_{res}^2 - (N-3)S'^2_{res}$$

Далее $$PG = \frac{DS^2}{S'^2_{res}}$$

Значение PG сравнивают с предельным значением $F_{1-\alpha}$, заданным в таблице Фишера-Снедекора для уровня доверия 1-α и степени свободы 1 и (N - 3).

ПРИМЕЧАНИЕ: Обычно используют α риск 15%. В некоторых случаях тест может быть оптимистичным, и риск в 10% окажется более реалистичным.

Если PG ≤ $F_{1-\alpha}$: нелинейная калибровочная функция не приводит к улучшенной регулировке; например, функция калибровки является линейной.

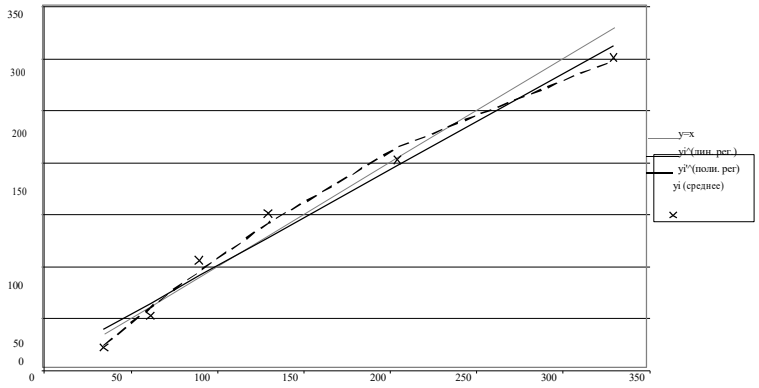
Если PG > $F_{1-\alpha}$: объем работ должен быть максимально узким, чтобы получить линейную калибровочную функцию: в противном случае информационные значения из анализируемых проб должны быть оценены с помощью нелинейной калибровочной функции.

Пример: Теоретический случай.

	Ti (ref)	Y1	Y2	Y3	Y4
1	*35*	*22.6*	*19.6*	*21.6*	*18.4*
2	*62*	*49.6*	*49.8*	*53*	
3	*90*	*105.2*	*103.5*		
4	*130*	*149*	*149.8*		
5	*205*	*203.1*	*202.5*	*197.3*	
6	*330*	*297.5*	*298.6*	*307.1*	*294.2*

Линейная модель и полиномиальная модель, метод: теоретический случай

Средние измеренные значения



Принятые значения эталонных материалов

Линейная регрессия

$y = 1{,}48.x \pm 0{,}0015$

$S_{res} = 13{,}625$

Полиномиальная регрессия

$y = -0{,}0015x^2 + 1{,}485x \pm 27{,}2701$

$S'res = 7{,}407$

Тест Фишера

$PG = 10{,}534 > F(5\%) = 10{,}128$

PG>F линейная функция калибровки не может быть сохранена

5.3.2 Специфичность

5.3.2.1 Нормативное определение

Специфичность метода - способность метода измерять только искомое соединение.

5.3.2.2 Применение

В случае сомнения в специфичности испытуемого метода лаборатория может использовать графики для экспериментов, разработанные для проверки специфичности. Здесь предлагается два типа дополнительных экспериментов, которые можно проводить в большом количестве случаев из области энологии.

- Первое испытание – стандартное испытание на добавление. Может применяться для проверки того, что метод измеряет весь аналит.
- Второе испытание может применяться для проверки влияния других соединений на результат измерения.

5.3.2.3 Процедуры

5.3.2.3.1 Испытание на добавление стандарта

5.3.2.3.3.1.1 Область применения

Данное испытание можно применять для проверки того, что метод измеряет весь аналит.

График эксперимента опирается на стандартное добавление искомого соединения. Он применяется только к методам, которые не чувствительны к матричным эффектам.

5.3.2.3.1.2 Стандартный протокол

Речь идет об обнаружении значительной степени добавленных количеств на испытуемых материалах, проанализированных до и после добавок.

Проводят переменные стандартные добавления на ***n*** испытуемых материалах. Исходную концентрацию аналита в испытуемых материалах и стандартные добавки выбирают таким образом, чтобы охватить область применения метода. Испытуемые материалы должны состоять из тех типов матриц, которые используются для рутинного анализа. Рекомендуется использовать не менее 10 испытуемых материалов.

Результаты указывают в таблице в следующем виде:

Испыт. материал	**Кол-во до добавления** (x)	**Добавлен. кол-во** (v)	**Кол-во после добавления** (w)	**Обнаруж. кол-во** (r)
1	$x1$	$v1$	$w1$	$r1 = w1 \pm x1$
...	...	...	...	...
i	x_i	v_i	w_i	$r_i = w_i \pm x_i$
...	...	...	...	...
n	X_n	V_n	w_n	$r_p = w_n \pm x_n$

ПРИМЕЧАНИЕ 1: При добавлении используется чистый стандартный раствор. Рекомендуется проводить добавление того же порядка, что и количество испытуемого материала, на котором оно проводится. Поэтому необходимо разбавить наиболее концентрированные испытуемые материалы, чтобы не выходить за рамки метода.

ПРИМЕЧАНИЕ 2: Чтобы избежать систематической ошибки, рекомендуется готовить добавления с использованием независимых стандартных растворов.

ПРИМЕЧАНИЕ 3: Качество значений x и w может быть улучшено путем использования нескольких повторений.

5.3.2.3.1.3 Расчеты и результаты

Принцип измерения специфичности заключается в изучении прямой регрессии $\boldsymbol{r = a + b.v}$ и проверке того, что наклон $\boldsymbol{b}$ равен 1, а точка пересечения $\boldsymbol{a}$ равна 0.

5.3.2.3.1.3.1 Исследование прямой регрессии $\boldsymbol{r = a + b.v}$

Параметры прямой регрессии получают по следующим формулам:

- среднее значение добавленных количеств $\bar{v}$ $$\bar{v} = \frac{\sum_{i=1}^{n} v_i}{n}$$

- среднее значение найденных количеств $\bar{r}$ $$\bar{r} = \frac{\sum_{i=1}^{n} r_i}{n}$$

- расчетный наклон ***b***

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(v_i - \bar{v})(r_i - \bar{r})}{\sum_{i=1}^{n}(v_i - \bar{v})^2}$$

- расчетная точка пересечения ***a***

$$a = \bar{r} - b.\bar{v}$$

- значение регрессии, связанное с ***i-м*** эталонным материалом

$$\hat{r}_i = a + b \times v_i$$

- остаточное стандартное отклонение

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(r_i - \hat{r}_i)^2}{n-2}}$$

- стандартное отклонение по наклону

$$S_b = S_{res}\sqrt{\left(\frac{1}{\sum_{i=1}^{n}(v_i - \bar{v})^2}\right)}$$

- стандартное отклонение для точки пересечения

$$S_a = S_{res}\sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{v}^2}{\sum_{i=1}^{n}(v_i - \bar{v})^2}\right)}$$

5.3.2.3.1.3.2 Анализ результатов

Цель - сделать вывод об отсутствии каких-либо интерференций и о приемлемой специфичности. Это верно, если перекрывающаяся прямая $r = a + bv$ эквивалентна прямой $y = x$.

Для этого проводятся две проверки:

- Проверка предположения о том, что наклон *b* прямой перекрытия равен 1.
- Проверка предположения о том, что точка пересечения *a* равна 0.

Данные предположения проверяют с помощью критерия Стьюдента, обычно связанного с риском ошибки в 1%. В ряде случаев более реалистичным может оказаться риск в 5%.

Пусть $T_{критический,\ двусторонний}$ [dof; 1%] - двусторонняя переменная Стьюдента, связанная с риском ошибки в 1% для числа степеней свободы (dof).

Шаг 1: вычисления

Вычисление критерия сравнения по наклону на уровне 1

$$T_{obs}=\frac{|b-1|}{S_b}$$

Вычисление критерия сравнения по точке пересечения в точке 0

$$T'_{obs}=\frac{|a|}{S_a}$$

Вычисление критического значения Стьюдента: $T_{критический,\ двусторонний}$ [p-2; 1%]

Шаг 2: интерпретация

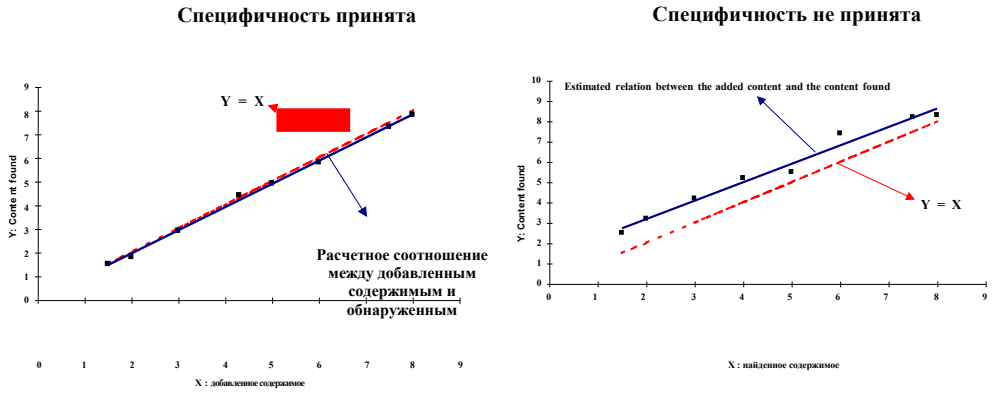
- Если T_{obs} меньше, чем $T_{критический}$, то наклон прямой регрессии равен 1
- Если T'_{obs} меньше, чем $T_{критический}$, то точка пересечения прямой регрессии равна 0.
- Если оба условия верны, то перекрывающаяся прямая эквивалентна $= y = x$, а метод считается специфическим.

ПРИМЕЧАНИЕ 1: На основании этих результатов для количественной оценки специфичности можно рассчитать средний коэффициент перекрытия. Ни при каких обстоятельствах нельзя использовать этот показатель для "корректировки" результатов. Это связано с тем, что при

обнаружении значительного смещения альтернативный метод не может быть валидирован относительно коэффициента эффективности 100%.
ПРИМЕЧАНИЕ 2: Поскольку принцип данного теста заключается в расчете прямой, необходимо взять как минимум три уровня сложения, и их значение должно быть правильно выбрано для оптимального распределения точек.

5.3.2.3.1.3.3 Графики с перекрывающимися прямыми

Пример специфичности



5.3.2.3.2 Исследование влияния других соединений на результат измерения

5.3.2.3.2.1 Область применения

Если возникают подозрения о взаимодействии других соединений, отличных от аналита, то лаборатория может составить график экспериментов и проверить влияние различных соединений. Предлагаемый здесь график экспериментов позволяет выискивать влияние соединений, определенных априори: владея знаниями об аналитическом процессе и ноу-хау, лаборатория должна быть в состоянии определить некоторое количество соединений, которые могут присутствовать в вине и влиять на результат анализа.

5.3.2.3.2.2.2 Стандартный протокол и расчет

Анализируют ***n*** вин в двух экземплярах до и после добавления соединения, которое предположительно влияет на результат анализа; ***n*** должно быть, по крайней мере, равно 10.

Сначала высчитывают средние значения Mx_i двух измерений x_i и x'_i, проведенных до добавления, далее - средние значения My_i двух измерений y_i и y'_i, проведенных после добавления, и, наконец - разницу d_i между значениями Mx_i и My_i.
Результаты эксперимента можно указать в таблице в следующем виде:

	x: До добавления		*y:* После добавления		Среднее		Разность
Пробы	**Пов.1**	**Пов.2**	**Пов.1**	**Пов.2**	***x***	***y***	***d***
1	x_1	x'_1	y_1	y'_1	Mx_1	My_1	$d_1 = Mx_1 - My_1$
...	...	...	...	...	...	...	...
i	x_i	x'_i	y_i	y'_i	Mx_i	My_i	$d_i = Mxi - My_i$
...	...	...	...	...	...	...	...
n	x_n	x'_n	y_n	y'_n	Mx_n	My_n	$d_n = Mx_n - My_n$

Среднее значение результатов до добавления $\boldsymbol{M_x}$

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} Mx_i$$

Среднее значение результатов после добавления $\boldsymbol{M_y}$

$$M_y = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} My_i$$

Вычисляют среднее значение разниц M_d

$$M_d = \sum_{i=1}^{n} \frac{d_i}{n} = My - Mx$$

Вычисляют стандартное отклонение разниц $\boldsymbol{S_d}$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

Вычисляют показатель Z

$$Z_{score} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.2.3.2.3 Интерпретация

- Если $Z_{score} \leq 2$, то можно считать, что добавленное соединение оказывает незначительное влияние на результат анализа с риском 5%.
- Если $Z_{score} \geq 2$, то можно считать, что добавленное соединение влияет на результат анализа с риском 5%.

ПРИМЕЧАНИЕ: Интерпретация Z_{score} возможна при условии, что изменения подчиняются нормальному закону с доверительной вероятностью 95%.

Пример: Исследование взаимодействия соединений, которые могут присутствовать в пробах, на определение глюкозы - фруктозы в винах методом инфракрасной спектрофотометрии с преобразованием Фурье (FTIR).

До дбавления	+ 250 мг/л$^{-1}$ сорбат калия	+ 1 г/л$^{-1}$ лицил. кислота	Разность

вино	пов.1	пов.2	пов.1	пов.2	пов.1	пов.2	сорбат разность	салицил. разность
1	*6.2*	*6.2*	*6.5*	*6.3*	*5.3*	*5.5*	*0.2*	*-0.8*
2	*1.2*	*1.2*	*1.3*	*1.2*	*0.5*	*0.6*	*0.05*	*-0.65*
3	*0.5*	*0.6*	*0.5*	*0.5*	*0.2*	*0.3*	*-0.05*	*-0.3*
4	*4.3*	*4.2*	*4.1*	*4.3*	*3.8*	*3.9*	*-0.05*	*-0.4*
5	*12.5*	*12.6*	*12.5*	*12.7*	*11.5*	*11.4*	*0.05*	*-1.1*
6	*5.3*	*5.3*	*5.4*	*5.3*	*4.2*	*4.3*	*0.05*	*-1.05*
7	*2.5*	*2.5*	*2.6*	*2.5*	*1.5*	*1.4*	*0.05*	*-1.05*
8	*1.2*	*1.3*	*1.2*	*1.1*	*0.5*	*0.4*	*-0.1*	*-0.8*
9	*0.8*	*0.8*	*0.9*	*0.8*	*0.2*	*0.3*	*0.05*	*-0.55*
10	*0.6*	*0.6*	*0.5*	*0.6*	*0.1*	*0*	*-0.05*	*-0.55*

Сорбат калия	*Md* =	*0.02*
	Sd =	*0.086*
	Z_{score} =	*0.23 <2*
Салициловая кислота	*Md* =	*-0.725*
	Sd =	*0.282*
	Z_{score} =	*2.57 >2*

В заключение можно сказать, что сорбат калия не влияет на определение глюкозы - фруктозы методом FTIR-измерения, изученным здесь. С другой стороны, салициловая кислота оказывает влияние, поэтому

следует избегать проб, содержащих салициловую кислоту, чтобы оставаться в пределах валидности для исследуемого метода измерения.

5.3.3 Исследование точности метода

5.3.3.1 Описание этапа

5.3.3.1.1 Определение термина

Корреляция между средним значением, полученным с помощью большой серии результатов испытаний, и принятым эталонным значением.

5.3.3.1.2 Общие принципы

Когда эталонное значение выдано сертифицированной системой, исследование точности может рассматриваться как связь прослеживаемости. Это относится, в частности, к двум конкретным случаям:

- прослеживаемость к сертифицированным эталонным материалам: в этом случае исследование точности можно проводить совместно с исследованием линейности и калибровки, опираясь на график экспериментов, описанный для такого исследования;
- прослеживаемость к сертифицированной цепочке межлабораторного сравнительного анализа.

Наиболее распространенными в обычных энологических лабораториях являются другие случаи, например, когда используются эталоны, не опирающиеся на сертифицированные системы. Они включают в себя следующие сравнения:

- сравнение с эталонным методом;
- сравнение с результатами не сертифицированной межлабораторной цепочки сравнительного анализа;
- сравнение с внутренними эталонными материалами или с внешними не сертифицированными эталонными материалами.

5.3.3.1.3 Справочная документация

- Стандарт NF V03-110, процедура внутрилабораторной валидации альтернативного метода в привязке к эталонному методу.
- Стандарт NF V03-115, руководство по использованию эталонных материалов.
- Стандарт ISO 11095, линейная калибровка с использованием эталонных материалов.
- Стандарт ISO 8466-1, качество воды - калибровка и оценка аналитических методов, оценка рабочих характеристик.

- Стандарт ISO 57025, точность результатов и методов измерения.

5.3.3.2 Сравнение альтернативного метода с эталонным методом МОВВ

5.3.3.2.1 Область применения

Данный метод может применяться, если лаборатория использует эталонный метод МОВВ или отслеженный, валидированный метод, результативность которого известна и соответствует требованиям клиентов лаборатории.

Для изучения сравнительной точности двух методов целесообразно, прежде всего, обеспечить качество повторяемости валидируемого метода и сравнить его с эталонным методом. Метод по сравнению повторяемости описан в главе о повторяемости.

5.3.3.2.2 Точность альтернативного метода по сравнению с эталонным методом

5.3.3.2.2.1 Определение термина

Точность определяется как степень близости между значениями, полученными эталонным и альтернативным методами, независимо от ошибок прецизионности двух методов.

5.3.3.2.2.2 Область применения

Точность альтернативного метода по отношению к эталонному устанавливается для области применения, в которой повторяемость двух методов постоянна.

Как следствие, на практике часто бывает целесообразно разделить анализируемый диапазон значений на несколько участков или "уровней диапазона" (от 2 до 5), в которых, как можно обоснованно считать, повторяемость методов сравнима с константой.

5.3.3.2.2.3 Стандартный протокол и расчет

На каждом уровне диапазона точность основывается на серии из ***n*** испытуемых материалов со значениями концентрации аналита, покрывающими рассматриваемый уровень диапазона. Для получения значимых результатов требуется минимум 10 испытуемых материалов.

Каждый испытуемый материал должен быть проанализирован в двух экземплярах двумя методами в условиях повторяемости.

Необходимо вычислить средние значения Mx_i двух измерений x_i и x'_i, проведенных альтернативным методом, и средние значения My_i двух измерений y_i и y'_i, проведенных эталонным методом, а затем - разницу d_i между значениями Mx_i и My_i.
Результаты эксперимента можно указать в таблице в следующем виде:

	x: Альтер. метод		***y:*** Эталонный метод		Среднее		Разница
Испыт. материал	**Пов.1**	**Пов.2**	**Пов.1**	**Пов.2**	***x***	***y***	***d***
1	x_1	x'_1	y_1	y'_1	Mx_1	My_1	$d1 = Mx1 - My_1$
...	...	...	...	...	...	...	...
i	x_i	x'_i	y_i	y'_i	Mx_i	My_i	$d_i = Mxi - My_i$
...	...	...	...	...	...	...	...
n	x_n	x'_n	y_n	y'_n	Mx_n	My_n	$d_n = Mx_n - My_n$

Необходимо произвести следующие расчеты.
- Среднее значение результатов для альтернативного метода M_x

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} Mx_i$$

- Среднее значение результатов для эталонного метода M_y

$$M_y = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} My_i$$

- Вычисляют среднее значение разниц M_d

$$M_d = \sum_{i=1}^{n} \frac{d_i}{n} = Mx - My$$

- Вычисляют стандартное отклонение разниц S_d $$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

Вычисляют показатель Z_{score} $$Z_{score} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.3.2.2.4 Интерпретация

– Если Z_{score} **ниже** или равен 2,0, то можно считать, что точность одного метода по отношению к другому удовлетворительная на рассматриваемом уровне диапазона, с риском ошибки α = 5%.
– Если Z_{score} **выше** 2,0, то можно считать, что альтернативный метод не точен по отношению к эталонному на рассматриваемом уровне диапазона, с риском ошибки α = 5%.

ПРИМЕЧАНИЕ: Интерпретация Z_{score} возможна при условии, что изменения подчиняются нормальному закону с доверительной вероятностью 95%.

Пример: Исследование точности методом FTIR-измерения для определения глюкозы - фруктозы по отношению к ферментативному методу. Первый уровень диапазона охватывает шкалу от 0 до 5 г/л$^{-1}$, а второй уровень диапазона – шкалу от 5 до 20 г/л$^{-1}$.

Вино	FTIR 1	FTIR 2	Ферм.1	Ферм.2	di
1	*0*	*0.3*	*0.3*	*0.2*	*-0.1*
2	*0.2*	*0.3*	*0.1*	*0.1*	*0.2*
3	*0.6*	*0.9*	*0.0*	*0.0*	*0.7*
4	*0.7*	*1*	*0.8*	*0.7*	*0.1*
5	*1.2*	*1.6*	*1.1*	*1.3*	*0.2*
6	*1.3*	*1.4*	*1.3*	*1.3*	*0.0*
7	*2.1*	*2*	*1.9*	*2.1*	*0.0*
8	*2.4*	*0*	*1.1*	*1.2*	*0.1*
9	*2.8*	*2.5*	*2.0*	*2.6*	*0.3*
10	*3.5*	*4.2*	*3.7*	*3.8*	*0.1*
11	*4.4*	*4.1*	*4.1*	*4.4*	*0.0*
12	*4.8*	*5.4*	*5.5*	*5.0*	*-0.2*

Md *0.13*
Sd *0.23*
Z_{score} *0.55 < 2*

Вино	FTIR 1	FTIR 2	Ферм.1	Ферм.2	di
1	*5.1*	*5.4*	*5.1*	*5.1*	*0.1*
2	*5.3*	*5.7*	*5.3*	*6.0*	*-0.2*
3	*7.7*	*7.6*	*7.2*	*7.0*	*0.6*
4	*8.6*	*8.6*	*8.3*	*8.5*	*0.2*
5	*9.8*	*9.9*	*9.1*	*9.3*	*0.6*
6	*9.9*	*9.8*	*9.8*	*10.2*	*-0.1*
7	*11.5*	*11.9*	*13.3*	*13.0*	*-1.4*
8	*11.9*	*12.1*	*11.2*	*11.4*	*0.7*
9	*12.4*	*12.5*	*11.4*	*12.1*	*0.7*
10	*16*	*15.8*	*15.1*	*15.7*	*0.5*
11	*17.7*	*18.1*	*17.9*	*18.3*	*-0.2*
12	*20.5*	*20.1*	*20.0*	*19.1*	*0.7*

Md = *0.19*
Sd = *0.63*
Z_{score} = *0.30 < 2*

Для двух уровней диапазона показатель Z_{score} ниже 2. Исследованное здесь FTIR-измерение для определения глюкозы - фруктозы можно считать точным по отношению к ферментативному методу.

5.3.3.3 Сравнение межлабораторных испытаний

5.3.3.3.1 Область применения

Выделяют два типа межлабораторных испытаний:

1. **Совместные исследования** посвящены одному отдельному методу. Эти исследования проводятся для первоначальной валидации нового метода, в основном для определения стандартного отклонения межлабораторной воспроизводимости $\boldsymbol{SR_{inter}}$ (***метод***). Также можно получить среднее значение ***m***.

2. Межлабораторные цепочки сравнительного анализа, или **испытания на пригодность**. Эти испытания проводятся для валидации принятого в лаборатории метода и для планового контроля качества (см. § 5.3.3.3). Полученное значение является межлабораторным средним ***m***, а также стандартной межлабораторной воспроизводимостью и межметодным отклонением SR_{inter}.

Участие в цепочке анализов или в совместном исследовании позволяет лаборатории использовать получаемые результаты для изучения точности метода, чтобы обеспечить, прежде всего, его валидацию, а также плановый контроль качества.

Если межлабораторные испытания проводятся сертифицированной организацией, то такая сопоставительная работа обеспечит прослеживаемость метода.

5.3.3.3.2 Стандартный протокол и расчет

Для надлежащего сравнения рекомендуется использовать минимум 5 испытуемых материалов за период.

По каждому испытуемому материалу представляют два результата:

- среднее значение по всем лабораториям со значимыми результатами ***m***;
- стандартное отклонение для межлабораторной воспроизводимости SR_{inter}.

Лаборатория анализирует испытуемые материалы в ***p*** повторах, причем эти повторы проводятся в условиях повторяемости. ***p*** должно быть как минимум равно 2.

Кроме того, лаборатория должна иметь возможность проверить, что внутрилабораторная изменчивость (внутрилабораторная воспроизводимость) меньше межлабораторной изменчивости (межлабораторной воспроизводимости), заданной цепочкой анализа.

Для каждого испытуемого материала лаборатория рассчитывает Z_{score} по следующей формуле:

$$Z_{score} = \frac{|m_{lab} - m|}{S_{R-inter}}$$

Результаты можно указать в таблице в следующем виде:

Испыт. материал	Пов.1		Пов.j		Пов.p	Лаборатор. среднее	Цепоч. среднее	Стандарт. отклонение	Z_{score}
1	x_{11}	...	x_{1j}	...	x_{1p}	$m_{lab}=\frac{\sum_{j=1}^{p} x_{1j}}{p}$	m_1	$S_{R\text{-}inter(1)}$	$Z_{score}=\frac{\lvert m_{lab}-m_1 \rvert}{S_{R-inter(1)}}$
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
i	x_{i1}	...	x_{ij}	...	x_{ip}	$m_{lab}=\frac{\sum_{j=1}^{p} x_{ij}}{p}$	m_i	$S_{R\text{-}inter(i)}$	$Z_{score}=\frac{\lvert m_{lab}-m_i \rvert}{S_{R-inter(i)}}$
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
n	x_{n1}	...	x_{nj}	...	x_{np}	$m_{lab}=\frac{\sum_{j=1}^{p} x_{nj}}{p}$	m_n	$S_{R\text{-}inte(n)}$	$Z_{score}=\frac{\lvert m_{lab}-m_n \rvert}{S_{R-inter(n)}}$

5.3.3.3.3 Интерпретация

Если все результаты $\boldsymbol{Z_{score}}$ меньше 2, то результаты исследуемого метода можно считать идентичными результатам, полученным лабораториями, которые дали значимые результаты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Интерпретация $\boldsymbol{Z_{score}}$ возможна при условии, что изменения подчиняются нормальному закону с доверительной вероятностью 95%.

Пример: Цепочка межлабораторных анализов выдает на двух пробах следующие результаты для параметра свободного диоксида серы.

Проба	x_1	x_2	x_3	x_4	Лаб. среднее	Цепоч. среднее	Стандартное отклонение	Z_{score}
1	*34*	*34*	*33*	*34*	*33.75*	*32*	*6*	*0.29 <2*
2	*26*	*27*	*26*	*26*	*26.25*	*24*	*4*	*0.56 <2*

Можно заключить, что на этих двух пробах сравнение с цепочкой анализа является удовлетворительным.

5.3.3.4 Сравнение с эталонными материалами

5.3.3.4.1 Область применения

В ситуациях, когда эталонный метод (или любой другой) для данного параметра отсутствует, и параметр не обрабатывается в цепочках анализов, единственной оставшейся возможностью является сравнение результатов валидируемого метода с принятыми внутренними или внешними эталонными значениями материала.

Эталонными материалами, например, могут выступать синтетические растворы, приготовленные в стеклянной посуде класса А, и/или калиброванные метрологические инструменты.

В случае сертифицированных эталонных материалов сравнение представляет собой прослеживаемость и может проводиться одновременно с измерением и исследованием линейности.

5.3.3.4.2 Стандартный протокол и расчет

Рекомендуется иметь ***n*** эталонных материалов для данного уровня диапазона, в которых можно обоснованно оценить, что повторяемость сравнима с константой; ***n*** должно быть, по крайней мере, равно 10.
Каждый эталонный материал анализируют в двух экземплярах.
Вычисляют средние значения Mx_i для двух измерений x_i и x'_i, выполненных альтернативным методом.
Определяют $\mathbf{T_i}$ - принятое значение для i^{-ozo} эталонного материала.
Результаты можно указать в таблице в следующем виде:

	x: Альтернативный метод			***T***: Принят.значение эталонного материала	Разность d
Эталон. материал	**Пов.1**	**Пов.2**	**Сред. x**		
1	x_1	x'_1	Mx_1	T_1	$d_1 = Mx_1-T_1$
...			...	...	...
i	x_i	x'_i	Mx_i	T_i	$d_i = Mx_i-T_i$
...			...	...	...
n	x_n	x'_n	Mx_n	T_n	$d_n = Mx_n-T_n$

Среднее значение результатов для альтернативного метода $\boldsymbol{M_x}$

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} Mx_i$$

Среднее значение принятых результатов для эталонных материалов $\boldsymbol{M_T}$

$$M_T = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} T_i$$

Вычисляют среднее значение разниц $\boldsymbol{M_d}$

$$M_d = \sum_{i=1}^{n} \frac{d_i}{n} = Mx - M_T$$

Вычисляют стандартное отклонение разниц $\boldsymbol{S_d}$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

Вычисляют показатель $\boldsymbol{Z_{score}}$

$$Z_{score} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.3.4.3 *Интерпретация*

– Если $\boldsymbol{Z_{score}}$ **ниже** или равен 2,0, то можно считать, что точность альтернативного метода по отношению к принятым значениям эталонного материала хорошая на рассматриваемом уровне диапазона.

– Если $\boldsymbol{Z_{score}}$ **выше** 2,0, то можно считать, что альтернативный метод не точен по отношению к принятым значениям эталонного материала на рассматриваемом уровне диапазона.

ПРИМЕЧАНИЕ: Интерпретация Z_{score} возможна при условии, что изменения подчиняются нормальному закону с доверительной вероятностью 95%.

Пример: Не существует эталонного метода для сравнения результатов анализа 4-этилфенола (4-EP) методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Результаты сравниваются с принятыми значениями для эталонных материалов, состоящих из синтетических растворов, приготовленных на прослеживаемом оборудовании.

Испыт. аппарат	Ti (эт.)	Y1	Y2	Y3	Y4	My	di
1	*4.62*	*6.2*	*6.56*	*4.9*	*5.7*	*5.8*	*1.2*
2	*12.3*	*15.1*	*10.94*	*12.3*	*11.6*	*12.5*	*0.2*
3	*24.6*	*24.5*	*18*	*25.7*	*27.8*	*24.0*	*-0.6*
4	*46.2*	*48.2*	*52.95*	*46.8*	*35*	*45.7*	*-0.5*
5	*77*	*80.72*	*81.36*	*83.2*	*74.5*	*79.9*	*2.9*
6	*92.4*	*97.6*	*89*	*94.5*	*99.5*	*95.2*	*2.8*
7	*123.2*	*126.6*	*129.9*	*119.6*	*126.9*	*125.8*	*2.6*
8	*246.4*	*254.1*	*250.9*	*243.9*	*240.4*	*247.3*	*0.9*
9	*385*	*375.8*	*366.9*	*380.4*	*386.9*	*377.5*	*-7.5*
10	*462*	*467.5*	*454.5*	*433.3*	*457.3*	*453.2*	*-8.9*

$Md = -0.7$
$Sd = 4.16$
$Z_{score} = 0.16$

Учитывая эти результаты, значения, полученные методом анализа 4-EP с помощью ГХ-МС, можно считать точными по сравнению с принятыми значениями эталонных материалов.

5.4 Раздел третий: исследование случайных ошибок

5.4.1 Общий принцип

Случайная ошибка аппроксимируется на основе исследований прецизионности. Для расчета прецизионности используют методику, которая может быть применена в различных экспериментальных условиях, находящихся между условиями повторяемости и воспроизводимости, которые представляют собой экстремальные условия ее измерения.

Исследование прецизионности является одним из основных пунктов при изучении неопределенности измерения.

5.4.2 Справочная документация

- Стандарт ISO 5725, точность результатов и методы измерения;
- Стандарт NF V03-110, процедура внутрилабораторной валидации альтернативного метода в привязке к эталонному методу.

5.4.3 Прецизионность метода

5.4.3.1 Определение термина

Степень близости друг к другу независимых результатов испытаний, полученных при заранее заданных условиях.

ПРИМЕЧАНИЕ 1: Прецизионность зависит только от распределения случайных ошибок и не связана с истинным или заданным значением.
ПРИМЕЧАНИЕ 2: Измерение прецизионности выражается на основе стандартного отклонения результатов испытаний.
ПРИМЕЧАНИЕ 3: Выражение "независимые результаты испытаний" обозначает результаты, полученные методом, который не зависит от предыдущего результата по тому же или подобному испытуемому материалу. Количественные измерения прецизионности в значительной степени зависят от предписанных условий. Условия повторяемости и воспроизводимости - это конкретные группы экстремальных условий.

На практике прецизионность относится ко всем экспериментальным условиям в диапазоне между условиями повторяемости и воспроизводимости.

5.4.3.2 Область применения

Ниже подробно описаны протоколы и расчеты, начиная с общего теоретического случая и заканчивая конкретными случаями повторяемости и воспроизводимости. Такой исчерпывающий подход должен позволить применять исследование прецизионности в большинстве лабораторных ситуаций.

Исследование прецизионности априори может быть без труда применено к каждому количественному методу.

Во многих случаях прецизионность не является постоянной во всем диапазоне применимости метода. В этом случае целесообразно определить несколько участков или "уровней диапазона", в которых можно обоснованно считать, что прецизионность сравнима с константой. Расчет прецизионности повторяют для каждого уровня диапазона

5.4.3.3 Общий теоретический пример

5.4.3.3.1 Стандартный протокол и расчет

5.4.3.3.3.1.1 Расчеты с несколькими испытуемыми материалами

n испытуемых материалов анализируют в течение относительно длительного периода времени с несколькими повторами, p_i - число повторов для каждого ***i-ого*** испытуемого материала. Свойства испытуемых материалов должны оставаться постоянными в течение всего рассматриваемого периода.

Для каждого повтора измерение может быть выполнено с ***K*** повторениями (мы не учитываем здесь случай, когда число повторений ***K*** может варьироваться от одного испытуемого материала к другому, что еще больше усложнило бы расчеты).

Общее количество повторов должно быть больше 10, и их распределяют по всем испытуемым материалам.

Результаты можно указать в таблице в следующем виде, (пример, когда ***K*** =2)

Повторы	**1**		**...**		***j***		p_1		p_i		p_n	
Испыт.материалы												
1	x_{11}	x'_{11}	...	...	x_{1j}	x'_{1j}	x_{1p1}	x'_{1p1}				
...												
i	x_{i1}	x'_{i1}	...	...	x_{ij}	x'_{ij}	...	...	x_{ipi}	x'_{ipi}		
...												
n	x_{n1}	x'_{n1}	...	...	x_{nj}	x'_{nj}	...	...	...	...	x_{npn}	x'_{npn}

В этой ситуации стандартное отклонение общей изменчивости (или стандартное отклонение прецизионности S_v) дается общим выражением:

$$S_v = \sqrt{Var(\bar{x}_{ij}) + (1 - \frac{1}{k}) Var(répet)}$$

где:

$Var(\bar{x}_{ij})$ - дисперсия среднего значения многократных повторений всех испытуемых материалов.

Var(répet) - дисперсия повторяемости всех повторений.

- Если испытуемые материалы проанализированы в двух экземплярах при каждом повторе (***K*** = 2), выражение становится:

$$S_v = \sqrt{Var(\bar{x}_{ij}) + \frac{Var(repeat)}{2}}$$

- Если проведено только одно измерение испытуемого материала при каждом повторе (***K*** = 1), дисперсия повторяемости равна нулю, выражение становится:

$$S_v = \sqrt{Var(\bar{x}_{ij})}$$

- **Вычисление** $Var(\bar{x}_{ij})$

Среднее значение двух повторов x_{ij} и x'_{ij}:

$$\bar{x}_{ij} = \frac{x_{ij} + x'_{ij}}{2}$$

Для каждого испытуемого материала рассчитывается среднее значение для ***n*** повторов:

$$Mx_i = \frac{\sum_{j=1}^{p_i} \bar{x}_{ij}}{p_i}$$

Число различных измерений ***n*** равно сумме p_i.

$$N = \sum_{i=1}^{n} p_i$$

Дисперсия $Var(\bar{x}_{ij})$ определяется следующим уравнением

$$Var(x_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p_i}(\bar{x}_{ij} - M_{x_i})^2}{N - n}$$

ПРИМЕЧАНИЕ: Данную дисперсию также можно рассчитать с помощью дисперсий изменчивости каждого испытуемого материала: ***Varį (xj)***. В этом случае используется следующее соотношение (оно строго эквивалентно предыдущему):

$$Var(x_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^{n}(p_i - 1).Var_i(x_j)}{N - n}$$

- **Вычисление** *Var (repeat)*

Дисперсия повторяемости высчитывается как обычное уравнение повторяемости при использовании ***n*** испытуемых материалов в двух экземплярах. В соответствии с расчетом повторяемости, рассмотренным в разделе "Повторяемость", для ***K = 2*** дисперсия повторяемости составляет:

$$Var(repeat) = \frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n_i} w_{ij}^{\ 2}}{2N} \qquad \text{где} \qquad w_{ij} = x_{ij} - x'_{ij}$$

Прецизионность ***v*** рассчитывается по формуле:

$$v = 2\sqrt{2}.S_v = 2.8.S_v$$

Значение прецизионности ***v*** означает, что в 95% случаев разность между двумя значениями, полученными данным методом при определенных условиях, будет меньше или равна ***v***.
ПРИМЕЧАНИЕ 1: Использование и интерпретация этих результатов основаны на предположении, что изменения подчиняются нормальному закону с доверительной вероятностью 95%.
ПРИМЕЧАНИЕ 2: Можно также определить точность в 99% при $v=2.58\sqrt{2}.S_v=3.65.S_v$

5.4.3.3.1.2 Расчеты с 1 испытуемым материалом

В этой ситуации вычисления упрощаются. Целесообразно выполнить ***p*** повторов измерений испытуемого материала, при необходимости с повторением измерения при каждом повторе. ***p*** должно быть, по крайней мере, равно 10.
При последующих расчетах считается, что измерения проводят в двух экземплярах при каждом повторе.
- Дисперсия $Var(\bar{x}_{ij})$ определяется следующим уравнением:

$$Var(x_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^{p}(\bar{x}_i - M_x)^2}{p-1}$$

где:

$\bar{x}_i$- среднее значение двух повторений повтора *i*;
p - число повторов;
$\boldsymbol{M_x}$ - среднее значение всех повторов.

- Дисперсия *Var*(*repeat*) определяется следующим уравнением:

$$Var(repeat) = \frac{\sum_{i=1}^{p} w_i^2}{2p}$$

где w_i: разница между двумя повторениями повтора ***i****.*

5.4.3.4 Повторяемость

5.4.3.4.1 Определения

Повторяемость - это степень близости между взаимонезависимыми результатами анализа, полученными рассматриваемым методом на одном и том же вине, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования, в течение короткого периода времени.

Эти экспериментальные условия будут называться условиями повторяемости.

Значение повторяемости **r** - это значение, ниже которого, как считается, расположена абсолютная разность между двумя результатами одного и того же анализа, полученными при определенных выше условиях повторяемости, с доверительной вероятностью 95%.

Стандартное отклонение повторяемости **Sr** - это стандартное отклонение для результатов, полученных в условиях повторяемости. Это параметр дисперсии результатов, полученных в условиях повторяемости.

5.4.3.4.2 Область применения

Исследование повторяемости может быть априори без труда применено к любому количественному методу в тех случаях, когда можно соблюсти условия повторяемости.

Во многих случаях повторяемость не является постоянной во всем диапазоне применимости метода. Поэтому целесообразно определить несколько участков или "уровней диапазона", в которых можно обоснованно считать, что повторяемость сравнима с константой. Далее расчет повторяемости повторяют для каждого уровня диапазона.

5.4.3.4.3 Стандартный протокол и расчет

5.4.3.4.3.1 Общий случай

Количество испытуемых материалов может варьироваться в зависимости от ЧИСЛА повторов. На практике мы считаем, что число измерений всех испытуемых материалов должно быть больше 20. Не обязательно, чтобы условия повторяемости сохранялись от одного испытуемого материала к другому, но все повторы, произведенные на одном и том же испытуемом материале, должны быть выполнены при этих условиях повторяемости.

Повторяемость остается частным случаем расчета прецизионности

$$S_v = \sqrt{Var(\bar{x}_{ij}) + \frac{Var(repeat)}{2}}$$

Часть $Var(repeat)$ естественно равна 0 (только одно измерение с каждым повтором), и расчет аналогичен расчету $Var(x_{ij})$.

$$S_r = \sqrt{Var(x_{ij})} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p_i}(\bar{x}_{ij} - M_{x_i})^2}{N-n}}$$

Значение ***r*** означает, что в 95% случаев разность между двумя значениями, полученными в условиях повторяемости, будет меньше или равна ***r***.

5.4.3.4.3.2 Частный случай, применимый только к одному повторению

Наиболее актуальной ситуацией для автоматизированных систем является на практике анализ испытуемого материала только с одним повторением. Рекомендуется использовать не менее 10 материалов, чтобы достичь требуемых 20 измерений. Два повтора измерений одного и того же испытуемого материала должны проводиться в условиях повторяемости.

В этом конкретном случае расчет S_r упрощается и становится:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{q} w_i^2}{2p}}$$

где:

S_r = стандартное отклонение повторяемости;

p = количество испытуемых материалов, проанализированных в двух экземплярах;

w_i = абсолютные разницы между экземплярами.

Повторяемость r высчитывается по формуле:

$$r = 2.8\ Sr$$

Пример: Для рассматриваемого альтернативного метода определения свободного диоксида серы и для диапазона измерений от 0 до 50 мг/л оператор будет искать не менее 10 проб с равномерно распределенными концентрациями, колеблющимися между этими значениями.

Проба №	*xi (в мг/л)*	*x'i (в мг/л)*	*W_i (абсолют. значение)*
1	*14*	*14*	*0*
2	*25*	*24*	*1*
3	*10*	*10*	*0*
4	*2*	*3*	*1*
5	*35*	*35*	*0*
6	*19*	*19*	*0*
7	*23*	*23*	*0*
8	*27*	*27*	*0*
9	*44*	*45*	*1*
10	*30*	*30*	*0*
11	*8*	*8*	*0*
12	*48*	*46*	*2*

Пример: При использовании значений, данных в представленной выше таблице, получены следующие результаты:
Q = 12
Sr = 0,54 мг/л
R = 1,5 мг/л
Этот результат может быть использован для утверждения, что с 95% вероятностью результаты, полученные исследуемым методом, будут иметь уровень повторяемости ниже 1,5 мг/л.

5.4.3.4.4 Сравнение повторяемости

5.4.3.4.4.1 Определение повторяемости каждого метода

Для оценки эффективности метода может быть полезно сравнить его повторяемость с повторяемостью эталонного метода.

Пусть $S_{r\text{-}alt}$ - стандартное отклонение воспроизводимости альтернативного метода, а $S_{r\text{-}ref.}$ - стандартное отклонение повторяемости эталонного метода.

Сравнение является прямым. Если значение повторяемости альтернативного метода ниже или равно значению повторяемости эталонного метода, то результат положительный. Если оно выше, то лаборатория должна убедиться, что результат соответствует спецификации, принятой для данного метода. В последнем случае можно прибегнуть к тесту Фишера-Снедекора, чтобы узнать, является ли значение, полученное для альтернативного метода, значительно выше, чем для эталонного метода.

5.4.3.4.4.2 Тест Фишера-Снедекора

Рассчитывают соотношение:

$$F_{obs} = \frac{S_{r_{alt}}^{2}}{S_{r_{ref}}^{2}}$$

Используют критическое значение Снедекора с риском **α**, равным 0,05, соответствующее переменной Фишера с уровнем доверия 1 α, в которой $v1$ = n(x)-n, и $v2$ = n(z)-m степеней свободы: F(N(x)-n, N(y)-m, 1 – α). В случае расчетной повторяемости только с одним повторением на p испытуемых материалах для альтернативного метода и q испытуемых материалах для эталонного метода, переменная Фишера будет иметь в качестве степени свободы $v1 = p$ b $v2 = Q$, т.е.: F (p, Q, 1 – α).

Интерпретация теста:

1/ $\mathbf{F_{obs} > F_{1-\square}}$**, α**, значение повторяемости альтернативного метода значительно выше, чем у эталонного.

2/ $\mathbf{F_{obs} < F_{1-\square}}$**, α** мы не можем утверждать, что значение повторяемости альтернативного метода значительно выше, чем эталонного.

Пример*: Значение стандартного отклонения повторяемости, найденное для метода определения свободного диоксида серы, составляет:*

Sr *= 0,54 мг/л*

Лаборатория провела определение на тех же испытуемых материалах эталонным методом МОВВ. Значение стандартного отклонения повторяемости, найденное в этом случае, составляе

Sref *= 0,39 мг/л*

$$F_{obs} = \frac{0.54^2}{0.39^2} = \frac{0,29}{0,15} = 1,93$$

$v_2 = 12$
$v_1 = 12$
$\boldsymbol{F_{1-\alpha}} = 2,69 > 1,93$

Полученное значение F_{obs} ниже, чем значение $\boldsymbol{F_{1-\alpha}}$; мы не можем утверждать, что значение повторяемости альтернативного метода значительно выше, чем у эталонного метода.

5.4.3.5 Внутрилабораторная воспроизводимость

5.4.3.5.1 *Определение термина*

Внутрилабораторная воспроизводимость - это степень близости между результатами анализа, полученными рассматриваемым методом на одном и том же вине, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором или разными операторами, использующими разные кривые тарировки, в разные дни.

5.4.3.5.2 Область применения

Исследования воспроизводимости можно проводить на количественных методах, если время анализа разумно ограничено, и если существует возможность поддерживать стабильность хотя бы одного испытуемого материала в течение какого-то времени.

Во многих случаях воспроизводимость не является постоянной во всем диапазоне применимости метода. В этом случае целесообразно определить несколько участков или "уровней диапазона", в которых можно обоснованно считать, что воспроизводимость сравнима с константой. Затем расчет воспроизводимости должен быть повторен для каждого уровня диапазона.

5.4.3.5.3 Стандартный протокол и расчет

Лаборатория выбирает один или несколько стабильных испытуемых материалов, регулярно применяет метод в течение периода, равного как минимум одному месяцу, и сохраняет полученные результаты ($\mathbf{X_{ij}}$, **материал *i*, повтор *j***). Для каждого испытуемого материала рекомендуется не менее 5 повторов, общее минимальное количество повторов - 10. Повторы могут быть проанализированы в двух экземплярах.

Расчет прецизионности полностью применяют к расчету воспроизводимости, интегрируя *Var* (*repeat*), если измерения проводят в двух экземплярах.

Воспроизводимость ***R*** рассчитывают по формуле:

$$R = 2{,}8\ S_R$$

Значение ***R*** означает, что в 95% случаев разность между двумя значениями, полученными в условиях воспроизводимости, будет меньше или равна ***R***.

Пример: Исследование воспроизводимости при определении сорбиновой кислоты в винах методом паровой дистилляции и считывания по абсорбции при 256 Nm.
Два различных сорбированных вина хранились в течение трех месяцев. Определение сорбиновой кислоты проводилось через регулярные промежутки времени в течение этого периода с повторением каждого измерения.

	Испыт. материал 1		Испыт. материал 2	
Повторы	**x1**	**x2**	**x1**	**x2**
1	*122*	*125*	*140*	*139*
2	*123*	*120*	*138*	*137*
3	*132*	*130*	*139*	*141*
4	*121*	*115*	*143*	*142*
5	*130*	*135*	*139*	*139*
6	*135*	*142*	*135*	*138*
7	*137*	*135*	*139*	*139*
8	*130*	*125*	*145*	*145*
9	*123*	*130*	*138*	*137*
10	*112*	*115*	*135*	*134*
11	*131*	*128*	*146*	*146*
12			*137*	*138*
13			*146*	*147*
14			*145*	*148*
15			*130*	*128*

$n = 2$
$p_1 = 11$
$p_2 = 15$
$n = 26$

$Var(x_{ij}) = 37,8$
$Var(repet) = 5,01$
$S_R = 6,35$
$R = 17,8$

6. Контроль качества методов анализа (ВКК)

6.1 Справочная документация

- Резолюция МОВВ OENO 19/2002: Гармонизированные рекомендации по внутреннему контролю качества в аналитических лабораториях.
- CITAC/EURACHEM: Руководство по качеству в аналитической химии, издание 2002 г.;
- Стандарт NF V03-115, Руководство по использованию эталонных материалов.

6.2 Общие принципы

Напомним, что на результат анализа могут влиять два типа ошибок: систематическая ошибка, переходящая в смещение, и случайная ошибка. Для серийных анализов можно выделить другой тип ошибки, который может быть обусловлен как систематической, так и случайной ошибками: это эффект серии, наглядно демонстрируемый, например, отклонением измерительной системы во время серии.
ВКК предназначен для мониторинга и контроля этих трех ошибок.

6.3 Справочные материалы

ВКК в основном опирается на использование результатов измерений эталонных материалов. Выбор материалов и их состав являются важными этапами, которые необходимо контролировать, чтобы обеспечить эффективную основу для системы.
Эталонный материал определяется двумя параметрами:

- матрицей;
- присваиванием эталонного значения.

Возможны различные варианты; встречающиеся в энологии случаи обобщены в следующей таблице с двойным входом:

Матрица

	Синтетический раствор	**Натуральная матрица (вино и т.д.)**	**Допированное вино**
Эталонное значение	Синтетические растворы можно легко использовать для создания эталонных материалов. Они не совместимы с методами, при которых сигнал не является специфическим, и которые чувствительны к матричным эффектам.	Природные матрицы априори являются наиболее интересными эталонными материалами, поскольку гарантируют отсутствие риска матричного эффекта для методов, которые не являются идеально специфичными.	Допированное вино - это вино с искусственным добавлением аналита.
Значение, полученное по формуле	Раствор должен быть приготовлен в соответствии с правилами метрологии. Следует напомнить про возможную неопределенность значения, полученного по формуле. Подобное применение позволяет контролировать прецизионность, а также точность метода в какой-либо момент времени относительно калиброванного эталона.	Не применимо	Данный метод применим, когда базовое вино полностью свободно от аналита. Материалы этого типа подходят для энологических добавок, которые не являются естественными для вина. Если добавка наносится на родной компонент вина, матрица уже не может считаться натуральной. Добавку вносят в соответствии с правилами метрологии. Полученное значение подвержено неопределенности. В этом случае можно контролировать прецизионность метода, а также его точность в любой момент. Можно применять к методам, чувствительным к матричным эффектам для не натуральных соединений вина, но не для натуральных соединений вина.
Внешнее значение по лаборатории	Организация, поставляющая раствор, должна предоставить гарантии его качества и по возможности быть сертифицирована. Эталонные значения должны сопровождаться значением неопределенности на указанном уровне доверия. Это позволяет контролировать прецизионность метода и проверять его точность в какой-либо точке относительно внешнего значения. Значение прослеживаемости имеется в том случае, если организация-поставщик аккредитована для приготовления соответствующего эталонного материала. Не может применять с методами, чувствительными к матричным эффектам.	Внешнее значение было определено на вине цепочкой межлабораторных анализов. Некоторые организации предлагают кондиционированные образцы вина, чьи значения были определены подобным же образом. Однако в некоторых случаях вина, представленные таким образом, могут быть допированы и/или химически стабилизированы. Тогда может пострадать матрица. В этом случае можно проследить прецизионность метода и проверить его точность в любой точке по сравнению с внешней величиной. Значение прослеживаемости имеется на данном этапе, если цепочка анализа подлежит аккредитации. Можно применять с методами, чувствительными к матричным эффектам.	На практике для этого используют пробы кондиционированного вина, допированные и/или химически стабилизированные в соответствии с предложениями организаций. Эти материалы не могут претендовать на то, чтобы быть натуральной матрицей. Эталонные значения обычно получают при цепочке анализов. В этом случае можно контролировать прецизионность метода, а также его точность в любой точке по сравнению с внешним эталоном. На этом этапе соединение имеет значение прослеживаемости, если организация-поставщик аккредитована на подготовку данного эталонного материала. Не может применяться к методам, чувствительным к матричным эффектам.
Значение, полученное при эталонном методе	В случае, если синтетический раствор получен не с помощью калиброванного материала. Эталонное значение можно определить при анализе синтетического раствора эталонным методом. Измерение проводят не менее 3 раз. В качестве значения используют среднее значение из 3 результатов, если они находятся в пределах интервала меньшего, чем повторяемость метода. При необходимости оператор может проверить, насколько полученный результат согласуется со значением формулы раствора. В этом случае можно проследить прецизионность метода и проверить его точность в какой-либо точке по сравнению с эталонным методом. Не может применяться с методами, чувствительными к матричным эффектам.	Измерение проводят 3 раза эталонным методом, выбранное значение является средним из трех результатов, если они остаются в пределах интервала меньшего, чем повторяемость метода. В этом случае можно проследить прецизионность метода и проверить его точность в какой-либо точке по сравнению с эталонным методом. Можно применять с методами, чувствительными к матричным эффектам.	Измерение проводят 3 раза эталонным методом, сохраняемое значение является средним по трем результатам, если они остаются в пределах интервала меньшего, чем повторяемость метода. В этом случае можно контролировать прецизионность метода, а также его точность в любой точке по сравнению с эталонным методом. Можно применять к методам, чувствительным к матричным эффектам для не натуральных соединений вина, но не для натуральных соединений вина.
Значение, полученное методом контроля Применение значения инструмента в качестве эталонного значения не позволяет контролировать точность. Необходимо использовать альтернативный метод.	Эталонное значение измеряют проверяемым методом. Материал измеряют в 10 повторениях и проверяют, чтобы разность между этими значениями была меньше значения повторяемости; при необходимости можно отбросить наиболее экстремальные значения, не превышая двух удаленных значений. Для того чтобы обеспечить постоянство значений, полученных при 10 повторениях, эту серию необходимо проверять с помощью контрольных материалов, определенных в предыдущей сессии и размещенных в начале и в конце серии. В этом случае можно контролировать только прецизионность метода, а точность должна контролироваться другой процедурой.	Эталонное значение измеряют проверяемым методом. Материал измеряют в 10 повторениях и проверяют, чтобы разность между значениями была меньше, чем значение повторяемости; при необходимости можно отбросить наиболее экстремальные значения, не превышая двух удаленных значений. Для того чтобы обеспечить постоянство значений, полученных при 10 повторениях, эту серию необходимо проверить с помощью контрольных материалов, определенных в предыдущей сессии и размещенных в начале и в конце серии. Полученное значение можно также сравнить со значением, полученным эталонным методом (например, за 3 повторения). Разница между двумя значениями должна быть меньше, чем расчетная точность альтернативного метода по сравнению с эталонным. Это особенно полезно, когда метод дает случайную ошибку воспроизводимости, специфичную для каждой пробы, в частности, из-за неспецифичности измеряемого сигнала. Эта ошибка часто незначительна и меньше неопределенности, но может породить систематическую ошибку, если метод настраивается на одно единственное значение. Это позволяет контролировать прецизионность метода, а точность придется проверить с помощью другого подхода. Это очень интересный случай FTIR.	Эталонное значение измеряют с помощью проверяемого метода. Материал измеряют в 10 повторениях и проводят проверку, чтобы убедиться, что разница между этими значениями меньше, чем значение повторяемости; могут быть отброшены самые экстремальные значения, не превышая двух удаленных значений. Для того чтобы обеспечить постоянство значений, полученных при 10 повторениях, эту серию необходимо проверить с помощью контрольных материалов, определенных в предыдущей сессии и размещенных в начале и в конце серии. В этом случае можно контролировать только прецизионность метода, а точность должна контролироваться другой процедурой. Можно применять к методам, чувствительным к матричным эффектам для не натуральных соединений вина, но не для натуральных соединений вина.

6.4 Проверка аналитической серии

6.4.1 Определение термина

Аналитическая серия - серия измерений, проводимых в условиях повторяемости.

Для лаборатории, которая в основном использует метод аналитической серии, необходимо провести проверку, чтобы убедиться в правильности мгновенной регулировки измерительных приборов и их стабильности во время аналитической серии.

Возможны два взаимодополняющих подхода:

- использование эталонных материалов (часто называемых обобщенно "контрольными материалами");
- использование внутреннего стандарта, в частности, для сепарационных методов.

6.4.2 Проверка точности с использованием эталонных материалов

Систематическую ошибку можно проверить путем введения эталонных материалов, эталонное значение которых было установлено с помощью средств, внешних по отношению к проверяемому методу.

Измеренное значение эталонного материала связано с пределом допуска, в границах которого измеренное значение принимается как достоверное. Лаборатория определяет значения допусков для каждого параметра и для каждой аналитической системы. **Данные значения являются индивидуальными для каждой лаборатории**.

Контрольные материалы выбирают таким образом, чтобы их эталонные значения соответствовали уровням значений, обычно встречающимся для данного параметра. Если шкала измерения широкая, а неопределенность измерения на шкале не постоянная, следует использовать несколько контрольных материалов, чтобы охватить различные уровни диапазона.

6.4.3 Внутрисерийная прецизионность

Когда аналитические серии достаточно длинные, существует риск дрейфа аналитической системы. В этом случае внутрисерийную прецизионность проверяют с использованием одного и того же контрольного материала, расположенного в серии через регулярные интервалы. Можно использовать те же контрольные материалы, что и при определении точности.

Вариация измеренных значений для одного и того же эталонного материала в

течение серии должна быть меньше, чем значение повторяемости *r*, рассчитанное для уровня доверия 95%.
ПРИМЕЧАНИЕ: Для уровня доверия 99% можно использовать значение $3,65,S_r$.

6.4.4 Внутренний стандарт

Некоторые сепарационные методы позволяют вводить в анализируемый продукт внутренний стандарт.
В этом случае внутренний стандарт должен быть введен с помощью калиброванного материала с известной неопределенностью измерения.
Внутренний стандарт позволяет проверить как внутрисерийную точность, так и прецизионность. Следует отметить, что дрейф влияет на сигналы аналита и внутреннего стандарта в равных пропорциях; поскольку значение аналита рассчитывается по значению сигнала внутреннего стандарта, влияние дрейфа аннулируется.
Серия будет валидирована, если внутренние стандарты находятся в пределах установленных допустимых значений.

6.5 Проверка аналитической системы

6.5.1 Определение термина

Это дополнительная проверка к проверке серии. Она отличается от последней тем, что собирает значения, полученные в течение длительного периода, и/или сравнивает их со значениями, полученными с помощью других аналитических систем.
Рассмотрим два применения:
- карты Шухарта для контроля стабильности аналитической системы;
- внутреннее и внешнее сравнение аналитической системы.

6.5.2 Карта Шухарта

Карты Шухарта - графические статистические инструменты, служащие для мониторинга дрейфа измерительных систем путем регулярного анализа стабильных эталонных материалов, на практике в условиях воспроизводимости.

6.5.2.1 Сбор данных

Стабильный эталонный материал измеряют через определенные регулярные интервалы в течение достаточно длительного периода. Измерения регистрируют и заносят в контрольные карты

Измерения проводят в условиях воспроизводимости и фактически используют для расчета воспроизводимости и оценки неопределенности измерений.

Значения аналитических параметров выбранных эталонных материалов должны находиться в пределах допустимых диапазонов измерений.

Эталонные материалы анализируют в течение аналитической серии, по возможности стандартной, с переменным положением в серии от раза к разу. На практике вполне допустимо использовать измерения контрольных материалов серии для ввода контрольных карт.

6.5.2.2 Представление результатов и определение пределов

Отдельные результаты сравнивают с принятым значением эталонного материала и со стандартным отклонением воспроизводимости для рассматриваемого параметра на рассматриваемом уровне диапазона.

На картах Шухарта определяют два типа пределов: пределы, связанные с отдельными результатами, и пределы, связанные со средним значением.

Пределы для отдельных результатов обычно опираются на значениях стандартного отклонения для внутрилабораторной воспроизводимости для рассматриваемого уровня диапазона. Они бывают двух типов:

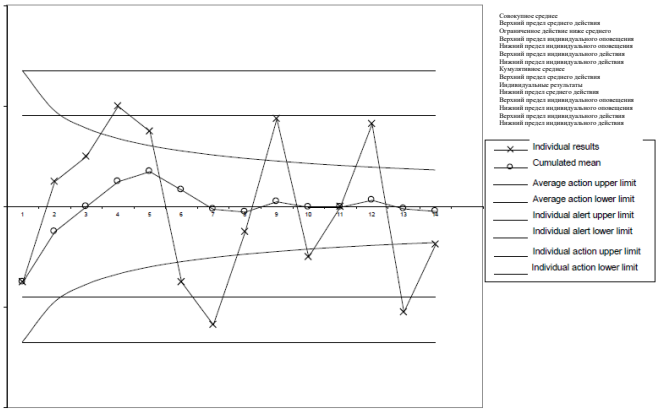
- предел предупреждения: +/- 2.S_R
- предел действия: +/- 3.S_R

Предел, определенный для кумулятивного среднего, сужается по мере увеличения числа измерений.

- Этот предел является пределом $+/-\frac{3.S_R}{\sqrt{n}}$ действия: ***n*** - число измерений, указанное на карте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для удобочитаемости предел предупреждения для кумулятивного среднего воспроизводится на контрольной карте редко и имеет значение $+/-\frac{2.S_R}{\sqrt{n}}$

+ /



6.5.2.3 Использование карты Шухарта

Ниже указаны наиболее часто используемые критерии работы. Лаборатории должны сами точно определить, какие критерии они применяют.

Корректирующие действия в отношении метода (или аппарата) будут предприняты:

a) если отдельный результат выходит за пределы действия индивидуальных результатов;

b) если два последовательных индивидуальных результата находятся вне пределов действия индивидуальных результатов;

c) если, кроме того, апостериорный анализ контрольных карт указывает на дрейф метода в трех случаях:

- девять последовательных точек индивидуальных результатов расположены по одну сторону от линии эталонных значений;
- шесть последовательных точек отдельных результатов поднимаются или опускаются;
- две последовательные точки из трех расположены между пределом предупреждения и пределом действия;

d) если среднее арифметическое из ***n*** зарегистрированных результатов выходит за один из пределов действия кумулятивного среднего значения (что свидетельствует о систематическом отклонении результатов).

ПРИМЕЧАНИЕ: Контрольная карта должна быть пересмотрена при ***n*** = ***1***, как только в отношении метода будет проведено корректирующее действие.

6.5.3 Внутреннее сличение систем анализа

В лаборатории, имеющей несколько методов анализа определенного параметра, проведение измерений одинаковых тестовых материалов представляет интерес для сравнения результатов. Соответствие результатов двух методов считается удовлетворительным, если их расхождение в 2 раза ниже стандартного отклонения разности, рассчитанного в ходе валидации при уровне достоверности 95 %.

ПРИМЕЧАНИЕ — такая интерпретация возможна при допущении, что расхождение подчиняется нормальному закону с доверительной вероятностью 95 %.

6.5.4 Внешнее сличение систем анализа

6.5.4.1 Цепочка анализа межлабораторных сличений

Организация испытаний и расчетов приведена в главе «Сравнение с цепочкой межлабораторных анализов».

В дополнение к проверке точности по Z_{score} результаты могут быть проанализированы более подробно, в частности, в отношении положения лабораторных значений по отношению к среднему значению. Если они систематически находятся на одной и той же стороне среднего значения для нескольких последовательных цепочек анализа, это может оправдать выполнение лабораторией корректирующих действий, даже если Z_{score} остается ниже критического значения.

ПРИМЕЧАНИЕ. Такая интерпретация Z_{score} возможна при допущении, что расхождение подчиняется нормальному закону с доверительной вероятностью 95 %.

Если цепочка взаимного сличения подлежит аккредитации, работа по сличению пригодится для прослеживания.

6.5.4.2 Сличение с внешними эталонными материалами

Для контроля возникновения систематической ошибки (смещения) также может использоваться измерение внешних эталонных материалов через регулярные промежутки времени.

Данный метод заключается в измерении внешнего эталонного материала для последующего принятия или отклонения полученного значения исходя из допустимых пределов. Такие пределы определяются в отношении

сочетания неопределенностей контролируемого метода и контрольного значения эталонного материала.

6.5.4.2.1 Стандартная неопределенность эталонного материала

Эталонные значения таких материалов сопровождаются доверительными интервалами. Лаборатория должна определить характер этих данных и вывести из них стандартное значение неопределенности для эталонного значения S_{ref}. Необходимо разграничивать следующие случаи:

- Случай, в котором неопределенность ***a*** задается в виде доверительного интервала в 95 % (расширенная неопределенность). Это означает, что был принят нормальный закон. Следовательно, ***a*** представляет собой «расширенную неопределенность» и соответствует 2-кратному стандартному отклонению S_{ref} от стандартной неопределенности эталонных значений предоставленных материалов.

$$S_{ref} = \frac{a}{2}$$

- Случай наличия сертификата или иной спецификации, где устанавливаются пределы +/- ***a*** без указания уровня доверительной вероятности. Для этого случая применяется прямоугольная дисперсия, при этом значение замера X имеет такую же вероятность неопределенного значения в интервале ***ref*+/- *a***.

$$S_{ref} = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

- Отдельный случай стеклянной посуды с пределами +/- ***a***. Это основа треугольной дисперсии.

$$S_{ref} = \frac{a}{\sqrt{6}}$$

6.5.4.2.2 Определение пределов достоверности измерения эталонного материала

К стандартной неопределенности S_{ref} относящейся к значению внешнего эталонного материала, прибавляется стандартная неопределенность проверяемого лабораторного метода S_{method}. Для определения пределов достоверности необходимо учитывать эти два источника изменчивости.

S_{method} рассчитывается на основе расширенной неопределенности лабораторного метода следующим образом:

$$S_{method} = \frac{неопределенность}{2}$$

Предел достоверности результата (с доверительной вероятностью 95 %) =

$$эталонное\ значение \quad +/-2\sqrt{S_{ref}^{\ 2} + S_{method}^{\ 2}}$$

Пример: для проверки pH-метра используется буферный раствор pH 7. Доверительный интервал для раствора pH составляет +/- 0,01. Указано, что этот доверительный интервал соответствует расширенной неопределенности с доверительной вероятностью 95 %. При этом расширенная погрешность pH-метра составляет 0,024.

Предел составит $+/-2\sqrt{(\frac{0.01}{2})^2 + (\frac{0.024}{2})^2}$

т.е. **+/- 0,026** по отношению к контрольному значению с доверительной вероятностью 95 %.

7. Оценка неопределенности измерений

7.1 Определение

Параметр, связанный с результатом измерения, характеризующий разброс значений, которые могут быть разумно присвоены измеряемой величине.
На практике неопределенность выражается в виде стандартного отклонения, называемого стандартной неопределенностью ***u(x)***, или в расширенной форме (обычно с k = 2) ***U = +/- k.u***

7.2 БИБЛИОГРАФИЯ

- AFNOR ENV 13005 Standard: 1999 – Guide for expressing measurement uncertainty
- EURACHEM, 2000. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, *EURACHEM second edition 2000*
- ISO 5725 Standard: 1994 – Exactitude (accuracy and precision) of results and measurement methods
- ISO 21748 standard: 2004 – Guidelines relating to the use of estimations of repeatability, reproducibility and accuracy in evaluating measurement uncertainty
- Perruchet C and Priel M., Estimating uncertainty, *AFNOR Publications, 2000*

7.3 Область применения

Неопределенность предоставляет два типа информации.

- С одной стороны, неопределенность информирует заказчиков лабораторных исследований о возможных отклонениях, которые необходимо учитывать для интерпретации результатов анализа. Однако следует отметить, что такая информация не может быть использована в качестве внешнего показателя оценки лаборатории.
- При этом неопределенность представляет собой динамичный внутренний инструмент для оценки качества результатов лабораторного анализа. Поскольку оценка неопределенности носит регулярный характер и основана на фиксированной, четко определенной методологии, ее можно использовать для наблюдения за изменением присущих методу расхождений в положительную или отрицательную сторону (в случае оценки, основанной исключительно на внутрилабораторных данных).

Настоящее руководство ограничивается предоставлением практической методологии для энологических лабораторий, занимающихся анализом серий образцов. Такие лаборатории располагают большими объемами данных значительного статистического масштаба.

Таким образом, оценка неопределенности может быть выполнена в большинстве случаев с использованием данных, собранных в рамках работы по валидации и контролю качества (в частности, с использованием данных диаграмм Шухарта). Эти данные могут быть дополнены графиками экспериментов, в частности, для определения систематических ошибок.

В эталонных системах имеется два основных подхода к определению неопределенности: внутрилабораторный подход и межлабораторный подход. Каждый из них дает результаты, которые естественным образом и существенно отличаются друг от друга. Их значение и их интерпретация не могут быть идентичными.

- **внутрилабораторный подход** обеспечивает характерный для рассматриваемого метода результат в рассматриваемой лаборатории. Возникающая в результате неопределенность является показателем эффективности лаборатории при использовании рассматриваемого метода. Заказчику, таким образом, предоставляется ответ на вопрос: «Какого разброса результатов можно ожидать от лаборатории использующей этот метод?»

- **межлабораторный подход** использует результаты межлабораторных исследований, предоставляющих информацию об общей эффективности рассматриваемого метода.

Лаборатории могут использовать оба эти подхода. Будет интересно посмотреть, дают ли результаты, полученные с использованием внутрилабораторного подхода, значения ниже значений межлабораторного подхода.

7.4 Методология

Работа по оценке неопределенности включает в себя 3 основных этапа.

- Определение измеряемой величины и описание метода количественного анализа
- Критический анализ процесса измерения
- Оценка неопределенности.
-

7.4.1 Определение измеряемой величины и описание метода количественного анализа

Прежде всего, необходимо указать следующее:

- цель проведения измерений
- измеренное количество
- Если измеряемая величина выводится путем расчета на основе измеренного количества, то следует указать математическую связь между ними по мере возможности.
- все условия эксплуатации.

Эти пункты включены в теоретическую часть процедур системы качества лабораторий.
В некоторых случаях выражение математической связи между измеряемой величиной и количествами может быть очень сложным (физические методы и т.д.), и их полная детализация не обязательно актуальна или возможна.

7.4.2 Критический анализ процесса измерения

Для составления бюджета неопределенности необходимо определить источники ошибок, влияющих на конечный результат. Можно оценить важность каждого источника для исключения тех, что оказывают лишь незначительное влияние. Это делается путем расчетов:

- степени серьезности дрейфа, вызванного ненадлежащим контролем рассматриваемого фактора
- периодичности возникновения возможных проблем
- их обнаруживаемости.

Такой критический анализ может быть проведен, например, с использованием метода «5M».

Сотрудники:
Влияние оператора
Вещество:
Эффект образца (стабильность, однородность, матричные эффекты) и расходные материалы (реагенты, продукты, растворы, эталонные материалы) и пр.
Оборудование:
Эффект оборудования (отклик, чувствительность, режимы интеграции и пр.) и лабораторное оборудование (весы, стеклянная посуда и пр.).
Метод:
Эффект применения процедуры (условия эксплуатации, последовательность операций и пр.).
Окружающая среда:
Условия окружающей среды (температура, давление, освещение, вибрация, радиация, влажность и пр.).

7.4.3 Оценочные расчеты стандартной неопределенности (внутрилабораторный подход)

7.4.3.1 Принцип

В случае лабораторий, использующих большие серии проб с ограниченным числом методов, наиболее подходящим подходом представляется статистический подход, основанный на внутрилабораторной воспроизводимости, дополненный расчетом

источников ошибок, не учитываемых в условиях внутрилабораторной воспроизводимости.

Результат анализа отклоняется от истинного значения под воздействием двух источников ошибок: систематических ошибок и случайных ошибок.

> **Результат анализа = истинное значение + систематическая ошибка + случайная ошибка**

Неопределенность характеризует разброс результатов анализа. Это приводит к стандартному отклонению.

Колебания (результат анализа) = неопределенность

Колебания (истинное значение) = 0

Колебания (систематическая ошибка) = $\sqrt{\sum S^2_{\text{систематич ошибки}}}$

Колебания (случайная ошибка) = $\boldsymbol{S_R}$ (стандартное отклонение внутрилабораторной воспроизводимости)

Поскольку стандартные отклонения при сложении возводятся в квадрат, расчетная стандартная неопределенность ***u(x)*** принимает следующий вид:

$$u(x) = \sqrt{\sum u^2_{\text{систематич ошибки}} + S^2}$$

Неинтегрируемые источники ошибок в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, т.е. систематические ошибки, определяются в форме стандартного отклонения, которое объединяется вместе со стандартным отклонением воспроизводимости.

Лаборатория может принять меры, чтобы применяемые условия воспроизводимости позволили включить максимальное количество источников ошибок. Это достигается, в частности, путем создания стабильных исследуемых материалов в течение достаточно длительного периода, в ходе которого лаборатория старается варьировать все возможные экспериментальные факторы. Таким образом, $\boldsymbol{S_R}$ будет охватывать наибольшее количество возможных источников ошибок (случайных), и работа, связанная с оценкой систематических ошибок, которую часто сложнее выполнять, будет сведена к минимуму.

Здесь следует отметить, что руководство EURACHEM/CITAC, озаглавленное «Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях», напоминает, что «В соответствии с общим

требованием Руководства ИСО следует вводить поправки на все выявленные и значимые систематические эффекты». Таким образом, в «контролируемом» методе систематические ошибки должны составлять незначительную часть неопределенности.

В следующей неполной таблице приведены примеры типичных источников ошибок и предложен подход к оценке для каждого из них, с максимально возможным использованием интеграции в условиях воспроизводимости.

Источник ошибки	***Тип ошибки***	***Примечания***	***Метод оценки***
Отбор образцов (состав образца)	Случайная	Отбор образцов является одним из «видов деятельности», определенных в стандарте ИСО 17025. Лаборатории, заявляющие, что они не проводят отбор образцов, не включают этот источник ошибки в оценку неопределенности.	Может быть включена во внутрилабораторную воспроизводимость путем включения отбора образцов при обработке.
Отбор аналитических проб (отбор части образца для проведения исследования)	Случайная	Имеет значение, если образец неоднороден. Для вина этот источник ошибок остается незначительным.	Включено в условия внутрилабораторной воспроизводимости, если используемый исследуемый материал аналогичен обычным исследуемым материалам.
Стабильность образца	Случайная	Зависит от условий хранения образца. В случае с винами лаборатории должны уделять пристальное внимание потерям диоксида серы и этанола.	Возможные изменения в образце могут быть интегрированы в условия воспроизводимости. Затем этот источник неопределенности может быть оценен в целом.
Калибровка устройства	Систематическая/случайная Эта ошибка является систематической, если измерения проводятся в течение длительного периода, и становится случайной, если измерения проводятся регулярно в течение времени, интегрированного с учетом воспроизводимости условиях воспроизводимости.	Источник ошибки, который необходимо учитывать в абсолютных методах.	Погрешность цепи калибровок п. 7.4.2.4.1 Учитывается в условиях воспроизводимости, если калибровка регулярно перепроверяется.

Эффект загрязнения или памяти	Случайная	Этот эффект сводится к минимуму благодаря правильной конструкции измерительных приборов и подходящим операциям промывки.	В условиях воспроизводимости этот эффект учитывается, если на различных позициях серии анализов включаются эталонные материалы.
Прецизионность автоматов	Случайная	Это относится, в частности, к внутрисерийному дрейфу. Этим можно управлять, в частности, путем размещения контрольных материалов внутри IQC	В условиях воспроизводимости этот эффект учитывается, если на различных позициях серии анализов включаются эталонные материалы.

Чистота реагентов	Случайная	Чистота реагентов очень мало влияет на соответствующие методы, поскольку измерения и анализы проводятся с использованием одних и тех же партий реагентов. Этот эффект следует учитывать в абсолютных методах.	Для интеграции в условиях воспроизводимости с использованием различных партий реагентов.
Условия измерения	Случайная	Воздействие температуры, влажности и пр.	Обычно учитывается в при условиях воспроизводимости.
Матричный эффект	Случайная от одного образца к другому, систематическая на одном и том же образце	Эти эффекты должны приниматься во внимание в методах, где измеряемый сигнал не является полностью специфичным.	Если этот эффект считается значительным, для оценки неопределенности, обусловленной этим эффектом, возможно использование график конкретного эксперимента п 7.4.2.4.3. Этот эффект не учитывается при условиях воспроизводимости.
Калибровочный эффект	Систематическая, если калибровка является постоянной. Случайная, если калибровка регулярно перепроверяется		Учитывается в условиях воспроизводимости, если калибровка регулярно перепроверяется. Если используемая калибровка остается прежней (в масштабе рассматриваемых периодов в рамках условий воспроизводимости), целесообразна реализация графика эксперимента для оценки погрешности цепи калибровок п. 7.4.2.4.1
Влияние оператора	Случайная		Должны быть приняты во внимание в условиях воспроизводимости, стараясь задействовать утвержденных операторов.
Смещение	Систематическая	Необходимо свести к минимуму с помощью контроля качества работы лаборатории.	Систематический эффект, может быть рассчитан с использованием сертифицированных ссылок.

7.4.3.2 Вычисление стандартного отклонения внутрилабораторной воспроизводимости

Стандартное отклонение воспроизводимости S_R рассчитывается с использованием протокола, описанного в разделе, озаглавленном «Внутрилабораторная воспроизводимость» (см. п. 5.4.3.5).

Расчет может быть основан на нескольких исследуемых материалах. Следует отметить, что в случае, когда S_R пропорционально размеру измеряемой величины, данные, собранные на основе нескольких исследуемых материалах с разными значениями, не следует объединять: S_R следует выражать в относительной величине (%).

7.4.3.3 Оценка типичных источников систематических ошибок, не учитываемых в условиях воспроизводимости

7.4.3.3.1 Ошибка измерения (или ошибка калибровки)

При нерегулярном выполнении калибровки прибора (или калибровки абсолютного метода), его получаемые данные не могут быть интегрированы в значения воспроизводимости. Необходимо составить график эксперимента для его оценки с применением остаточной ошибки регрессии.

7.4.3.3.1.1 Процедура

Подход аналогичен тому, что применялся при исследовании линейности метода.

Рекомендуется использовать число ***n*** эталонных материалов. Число должно быть больше 3, но не обязательно превышать 10. Эталонные материалы должны быть измерены ***p*** раз в условиях внутрилабораторной прецизионности, ***p*** должно быть больше 3, обычно рекомендуется 5. Принятые значения эталонных материалов необходимо регулярно распределить по исследуемому диапазону значений. Количество измерений должно быть одинаковым для всех эталонных материалов.

Результаты представлены в таблице следующим образом:

		Измеренные значения				
Эталон. материалы	**Принятое значение эталонного материала**	**Повт. 1**	**…**	**Повт. j**	**…**	**Повт. p**
1	x_1	y_{11}	…	y_{1j}	…	y_{1p}
…	…	…	…	…	…	…
i	x_i	y_{i1}	…	y_{ij}	…	y_{ip}
…	…	….	…	…	…	…
n	x_n	y_{n1}	…	y_{nj}	…	y_{np}

7.4.3.3.1.2 *Расчеты и результаты*

Рассчитывается модель линейной регрессии.

$$y_{ij} = a + b.x_i + \varepsilon_{ij}$$

где

y_{ij} является j-й репликой i-го эталонного материала.

x_i является принятым значением ***i-го*** эталонного материала.

b наклон линии регрессии.

a точка пересечения линии регрессии.

$a+b.x_i$ представляют собой математическое ожидание значения измерения ***i-го*** эталонного материала.

ε_{ij} представляет собой разницу между y_{ij} и ожидаемым значением измерения из ***i-го*** эталонного материала.

Параметры линии регрессии получаются с использованием следующих формул:

- среднее значение ***p*** измерений ***i-го*** эталонного материала

$$yi = \frac{1}{p}\sum_{j=1}^{p} y_{ij}$$

- среднее значение всех принятых значений n эталонных материалов

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$$

- среднее значение всех измерений

$$My = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i$$

-предполагаемый наклон кривой b $b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)^2}$

- предполагаемая точка пересечения a $a = M_y - b \times M_x$
- значение регрессии, связанное с $i^{м}$ эталонным материалом $\hat{y}_i$

$$\hat{y}_i = a + b \times x_i$$

- остаток e_{ij} $e_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_i$

7.4.3.3.1.3 *Оценка стандартной неопределенности, связанной с цепью измерений (или цепью калибровок)*

Если ошибки, вызванные линией регрессии, постоянны по всему полю, то стандартная неопределенность оценивается глобальным, единым способом по общему остаточному стандартному отклонению.

$$u_{(gauging)} = S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{np - 2}}$$

Если ошибки, вызванные линией регрессии, не являются постоянными по всему полю, то стандартная неопределенность оценивается для данного уровня по остаточному стандартному отклонению для этого уровня.

$$u_{(gauging),i} = S_{res,i} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \quad_i)^2}{p - 1}}$$

ПРИМЕЧАНИЕ. Эти оценки стандартных отклонений могут быть использованы, после валидации (см. п. 5.3.1) модели линейной регрессии и области измерения (или калибровки).

7.4.3.3.2 Ошибка смещения

В соответствии с руководством EURACHEM *«Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях»,* следует напомнить, что в соответствии с общим требованием Руководства ИСО следует вводить поправки на все выявленные и значимые систематические эффекты. То же самое относится и к смещению методов, для чего лаборатория внедряет свою систему контроля качества (см. п. 6), и которое стремится к 0 для «контролируемых методов».

На практике можно выделить два случая:

7.4.3.3.2.1 Методы скорректированы с использованием только одного сертифицированного эталонного материала

Смещение постоянно корректируется с помощью одного и того же эталонного материала.

Сертифицированный эталонный материал (CRM) обеспечивает метрологическую прослеживаемость метода. CRM было присвоено контрольное значение вместе с его стандартной неопределенностью u_{ref}.

Такая стандартная неопределенность CRM объединяется с составной неопределенностью метода, u_{comp}, для определения общей стандартной неопределенности лабораторного метода $u(x)$.

Таким образом, общая стандартная неопределенность метода, скорректированного с учетом рассматриваемого CRM, составляет:

$$u(x) = \sqrt{u_{ref}^{\ 2} + u_{comp}^{\ 2}}$$

ПРИМЕЧАНИЕ 1. Методология идентична для методов, скорректированных с учетом результатов цепочки межлабораторных сравнений.

ПРИМЕЧАНИЕ 2. Обращают внимание на разницу между CRM, используемым для корректировки смещения метода, в котором неопределенность его эталонного значения сочетается с неопределенностью метода, и CRM, используемого для контроля метода, скорректированного другими средствами (см. п. 6.5.4.2). Во втором случае неопределенность CRM не должна использоваться для оценки неопределенности метода.

7.4.3.3.2.2 Методы, скорректированные с использованием нескольких эталонных материалов (диапазоны измерений и пр.)

Помимо выполнения работ по калибровке, иного способа корректировки смещения не имеется.

Очевидно, что каждый калибратор вносит неопределенность смещения. Таким образом, существует общая теоретическая неопределенность смещения, представляющая сочетание неопределенностей каждого калибратора. Такую неопределенность очень сложно оценить, при этом она, как правило, оказывается достаточно низкой и ей можно пренебречь, в частности, если лаборатория контролирует качество своих калибраторов и неопределенность их эталонных значений. За исключением отдельных случаев, неопределенностью смещения здесь можно пренебречь.

7.4.3.3.3 Матричный эффект

7.4.3.3.3.1 Определение

Матричный эффект создает повторяющийся источник ошибок для одного образца и случайный в разных образцах. Эта ошибка связана с взаимодействием соединений, присутствующих в анализируемом продукте при измерении анализируемого вещества. Матричный эффект проявляется в методах с неспецифическим сигналом.

Матричный эффект часто составляет небольшую часть неопределенности, особенно в разделительных методах. В некоторых других методах, включая инфракрасные методы, это является значительным компонентом неопределенности.

Пример: Оценка матричного эффекта в отношении инфракрасной спектроскопии на основе преобразования Фурье (FTIR)

Сигнал для FTIR, или инфракрасного спектра, не является сигналом, специфичным для каждого из соединений, которые измеряются с помощью этого метода. Для обработки искаженных, неспецифических спектральных данных с достаточно точной оценкой значения измеряемой величины можно использовать статистическую модель измерений. Эта модель объединяет влияние других компонентов вина, которые варьируются от одного вина к другому и вносят ошибку в результат. Перед выполнением рутинной аналитической работы разработчики измерений проводят специальную работу, чтобы минимизировать этот матричный эффект и сделать измерения надежными, т.е. способными интегрировать эти изменения, не отражая их в результате. Тем не менее матричный эффект присутствует всегда и является источником ошибок, лежащих в основе значительной части неопределенности метода FTIR.

Для полной строгости эта ошибка матричного эффекта может быть оценена путем сравнения, с одной стороны, средних значений для большого числа реплик измерений FTIR, полученных на нескольких

эталонных материалах (не менее 10), в условиях воспроизводимости, и истинных значений эталонных материалов матрицы натуральных вин, с другой. Стандартное отклонение различий дает эту изменчивость измерений (при условии, что измерения были скорректированы заранее (смещение = 0)).

Этот теоретический подход не может быть применен на практике, потому что истинные значения никогда не известны, хотя экспериментально можно достаточно близко к ним подойти:

- В качестве предварительного, измерение FTIR должно быть статистически скорректировано (смещение = 0) по отношению к эталонному методу, основанному как минимум на 30 образцах. Это может быть использовано для устранения последствий смещения в последующих измерениях.
- Эталонные материалы должны быть натуральными винами. Желательно использовать не менее 10 различных эталонных материалов со значениями внутри уровня диапазона, неопределенность которого можно считать постоянной.
- Приемлемое эталонное значение определяется на основе среднего значения нескольких измерений эталонным методом, выполненных в условиях воспроизводимости. Это может быть использовано для снижения неопределенности эталонного значения: если для используемого эталонного метода все существенные источники неопределенности находятся в пределах условий воспроизводимости, умножение числа p измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, позволяет разделить неопределенность, связанную с их средним значением, на $\sqrt{p}$. Среднее значение, полученное с использованием достаточного числа измерений, будет тогда иметь низкий уровень неопределенности, даже незначительный по сравнению с неопределенностью альтернативного метода; и поэтому может использоваться в качестве эталонного значения. p должно быть, как минимум, равно 5.
- Эталонные материалы анализируются методом FTIR с использованием нескольких реплик, полученных в условиях воспроизводимости. Путем умножения числа измерений q в условиях воспроизводимости по методу FTIR можно уменьшить колебания, связанные с точностью метода (случайная ошибка). Среднее значение этих измерений будет иметь стандартное отклонение изменчивости, поделенное на $\sqrt{q}$. Затем эта случайная ошибка может стать незначительной по сравнению с колебаниями, связанными с измерением (матричным эффектом), которое мы пытаемся оценить. При

этом q должно быть, как минимум, равно 5.

Следующий пример используется для определения уксусной кислоты методом измерения FTIR. Контрольные значения получены путем 5 измерений в условиях воспроизводимости на 7 стабильных материалах исследования. Количество материалов порядка 7 теоретически недостаточно, данные здесь приведены только в качестве примера.

	Эталонный метод						***FTIR***						
Материалы						Средн.						Средн.	
	1	2	3	4	5	этал.	1	2	3	4	5	FTIR	Разница
1	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,30*	*0*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,305*	***-0,004***
2	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,31*	*0*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,315*	***-0,006***
3	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,38*	*0*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,37*	***-0,016***
4	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,24*	*0*	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,26*	***0,01***
5	*0,3*	*0,3*	*0,4*	*0,4*	*0,3*	*0,39*	*0*	*0,4*	*0,4*	*0,4*	*0,4*	*0,425*	***0,03***
6	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,26*	*0*	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,2*	*0,255*	***-0,008***
7	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,36*	*0*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,3*	*0,365*	***-0,008***

Вычисление разницы: ***разница = среднее значение FTIR – Средн. этал.***
Проверяется среднее значение разниц $M_d = 0{,}000$ (хорошая корректировка FTIR по сравнению с эталонным методом***)***
Стандартное отклонение разниц, $S_d = 0{,}015$**.** Именно это стандартное отклонение используется для оценки изменчивости, вызванной измерением, и поэтому мы можем утверждать, что:

$$Uf = 0{,}015$$

ПРИМЕЧАНИЕ. Следует отметить, что при таком подходе значение *Uf* может быть завышено. Если лаборатория сочтет, что в определенных здесь рабочих условиях значение значительно, она может увеличить количество измерений по эталонному методу и/или методу FTIR.

Условия воспроизводимости включают все другие существенные источники ошибок, S_R рассчитанное иным образом: ***SR = 0,017***
Неопределенность определения уксусной кислоты с помощью FTIR составляет:

$$+/-2*\sqrt{0.015^2+0.017^2} \text{ or } +/- 0.045\ g.L^{-1}$$

7.4.3.3.4 Эффект образца

В некоторых случаях графики экспериментов, используемые для оценки неопределенности, основаны на синтетических материалах исследований. В такой ситуации оценка не охватывает эффект образца (однородность). Поэтому лаборатории должны оценивать этот эффект. Следует, однако, отметить, что в энологических лабораториях, использующих однородные образцы в небольших количествах, этот эффект зачастую незначителен.

7.4.4 Оценка стандартной неопределенности с помощью межлабораторных исследований

7.4.4.1 Принцип

Межлабораторный подход использует данные, полученные в результате межлабораторных исследований, на основе которых рассчитывается стандартное отклонение межлабораторной воспроизводимости в соответствии с принципами, указанными в п. 5.4.3. Статистики, ответственные за расчет результатов межлабораторных исследований, могут выявлять «отклоняющиеся» лабораторные результаты, используя тесты, описанные в стандарте ИСО 5725 (тест Кохрана). Затем эти результаты могут быть устранены после согласования между статистиками и аналитиками.
Для оценки неопределенности с помощью межлабораторного подхода используются руководящие принципы, изложенные в стандарте ИСО 21748:

1. Стандартное отклонение воспроизводимости (межлабораторное), полученное в ходе совместного исследования, является достоверной основой для оценки неопределенности измерений
2. Эффекты, которые не наблюдаются в рамках совместного исследования, должны быть явно незначительными или явно приниматься во внимание.

Существует два типа межлабораторных исследований:

1. Совместные исследования, относящиеся только к одному методу. Эти исследования проводятся для первоначальной валидации нового метода с целью определения стандартного отклонения межлабораторной воспроизводимости ***SR inter (метод)***.
2. Цепочки межлабораторных сравнений или тесты на пригодность. Эти тесты проводятся для проверки метода, принятого лабораторией, и регулярного контроля качества (см. п. 5.3.3.3). Данные обрабатываются как единое целое и объединяют все методы анализа, используемые лабораториями, участвующими в исследованиях. Результаты представляют собой межлабораторное среднее значение ***m*** и стандартное отклонение межлабораторной и межметодной воспроизводимости SR_{inter}.

7.4.4.2 Использование стандартного отклонения межлабораторной и внутриметодной воспроизводимости SR_{inter} (метод)

Стандартное отклонение внутрилабораторной воспроизводимости SR_{inter} ***(метод)*** учитывает внутрилабораторную изменчивость и общую межлабораторную изменчивость, связанную с методом.

Затем необходимо принять во внимание тот факт, что метод анализа может привести к систематическому смещению по сравнению с истинным значением.

В рамках совместного исследования, когда это возможно, ошибка, вызванная таким смещением, может быть оценена с использованием сертифицированных эталонных материалов при тех же условиях, что описаны в п. 7.4.3.3.2, и добавлена в ***SR inter (метод)***

7.4.4.3 Использование стандартного отклонения межлабораторной и межметодической воспроизводимости SR_{inter}

Стандартное отклонение внутрилабораторной воспроизводимости SR_{inter} учитывает внутрилабораторную и межлабораторную изменчивость для исследуемого параметра.

Лаборатории необходимо проверить свою точность в отношении этих результатов (см. п. 5.3.3).

Нет необходимости добавлять компоненты, связанные с точностью метода, в бюджет неопределенности, поскольку в тестах на пригодность «с несколькими методами» можно считать, что ошибки точности учитываются в SR_{inter}.

7.4.4.4 Другие компоненты бюджета неопределенности

Поскольку материалы исследования, используемые для межлабораторных испытаний, являются репрезентативными для обычных образцов, анализируемых лабораториями, и если они соответствуют общей аналитической процедуре (отбор аналитических проб, экстракция, концентрация, разбавление, дистилляция и пр.), $S_{R\text{-}inter}$ представляет стандартную неопределенность ***u(x)*** метода, в межлабораторном смысле.

Ошибки, не учтенные в межлабораторных исследованиях, подлежат последующему изучению для оценки их совокупной стандартной неопределенности, которая будет объединена с совокупной стандартной неопределенностью межлабораторных исследований.

7.5 Выражение расширенной неопределенности

На практике неопределенность выражается в ее расширенной форме, в абсолютных значениях для методов, в которых неопределенность стабильна в рассматриваемой области, или относительных, если неопределенность изменяется пропорционально по отношению к количеству измеряемой величины:

Абсолютная неопределенность: $U = +/- 2.u(x)$

Относительная неопределенность **(в %):** $U = +/- \frac{2.u(x)}{\bar{x}}.100$

где среднее значение $\bar{x}$ представляет результаты воспроизводимости.

Примечание. Такое выражение неопределенности возможно при условии, что отклонения подчиняются нормальному закону с 95 %-ной доверительной вероятностью.

Такое выражение приводит к заданному значению неопределенности с доверительной вероятностью **95 %**.

БИБЛИОГРАФИЯ

(1) MOBB, 2001 – Сборник международных методов анализа вин и сусел; изд. *МОВВ, Париж.*

(2) MOBB, 2002 – Гармонизированные рекомендации по внутреннему контролю качества в аналитических лабораториях; *резолюция OENO 19/2002., Париж.*

(3) Стандарт ISO 5725: 1994 - Достоверность (точность и прецизионность) результатов и методов измерений, *классификационный индекс X 06-041-1.*

(4) Международный союз теоретической и прикладной химии (IUPAC), 2002 – Гармонизированное руководство по валидации аналитических методов анализа в одной лаборатории; *Pure Appl. Chem., том 74; №°5, стр. 835-855.*

(5) Стандарт ISO 11095: 1996 - Линейная калибровка с использованием стандартных материалов, *регистрационный номер ISO 11095:1996.*

(6) Стандарт ISO 21748: 2004 - Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и истинности при оценке неопределенности измерений, *регистрационный номер ISO ISO/TS 21748:2004.*

(7) Стандарт AFNOR V03-110: 1998 – Процедура межлабораторной валидации альтернативного метода по отношению к эталонному методу, *классификационный индекс V03-110.*

(8) Стандарт AFNOR V03-115: 1996 - Руководство по применению эталонных материалов, *классификационный индекс V03-115.*

(9) Стандарт AFNOR X 07-001: 1994 - Международный словарь основных и общих терминов по метрологии, *классификационный индекс X07-001.*

(10) Стандарт AFNOR ENV 13005: 1999 – Руководство по выражению неопределенности изменения.

(11) AFNOR, 2003 – Метрология на предприятии, инструмент качества, 2-е издание, *издание AFNOR 2003.*

(12) EURACHEM, 2000 - Количественная оценка неопределенности в аналитических измерениях, *второе издание EURACHEM 2000.*

(13) CITAC / EURACHEM, 2000 – Руководство по качеству в аналитической химии, *издание EURACHEM 2002.*

(14) Bouvier J.C., 2002 – Calcul de l'incertitude de mesure – Guide pratique pour les laboratories d'analyse oenologique, *Revue Française d'oenologie no. 197, Nov - Dec 2002, pp: 16-21.*

(15) Snakkers G. and Cantagrel R., 2004 - Utilisation des données des circuits de comparaison interlaboratoires pour apprécier l'exactitude des resultats d'un laboratoire Estimation d'une incertitude de mesure - *Bull OIV, Vol. 77 857-876, Jan - Feb 2004, pp: 48-83/*

(16) Perruchet C. and Priel M, 2000 – Estimer l'incertitude, *AFNOR Editions.*

(17) Neuilly (M.) and CETAMA, 1993 - Modélisation et estimation des erreurs de mesures, *Lavoisier Ed, Paris.*

Приложение N°1
Таблица A – Закон Снедекора

В данной таблице содержатся значения **F** в функции с ***v1*** и ***v2*** для риска
α 0,05
P=0,950

v1 / ***v2***	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	***v1*** / ***v2***
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	**1**
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	**2**
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	**3**
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	**4**
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	**5**
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	**6**
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	**7**
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	**8**
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	**9**
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	**10**
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	**11**
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	**12**
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	**13**
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	**14**
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	**15**
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	**16**
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	**17**
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	**18**
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	**19**
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	**20**
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	**21**
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	**22**
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	**23**
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	**24**
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	**25**
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	**26**
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	**27**
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	**28**
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	**29**
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	**30**
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	**40**
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	**60**
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	**120**
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	∞
v2 / ***v1***	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	***v2*** / ***v1***

Приложение N°2
Таблица B – Закон Стьюдента

В данной таблице содержатся значения **t** в функции с **P** и ***v***.

7.5.1.1. ***v***	**0,55**	**0,60**	**0,65**	**0,70**	**0,75**	**0,80**	**0,85**	**0,90**	**0,95**	**0,975**	**0,990**	**0,995**	**0,9995**	**P** ***v***
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	**1**
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598	**2**
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,929	**3**
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610	**4**
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	**5**
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	**6**
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	**7**
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041	**8**
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781	**9**
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	**10**
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437	**11**
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	**12**
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221	**13**
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140	**14**
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	**15**
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015	**16**
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965	**17**
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	**18**
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	**19**
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850	**20**
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819	**21**
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	**22**
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767	**23**
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	**24**
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725	**25**
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,884	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	**26**
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690	**27**
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	**28**
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	**29**
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646	**30**
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551	**40**
60	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460	**60**
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373	**120**
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291	∞
v **P**	**0,55**	**0,60**	**0,65**	**0,70**	**0,75**	**0,80**	**0,85**	**0,90**	**0,95**	**0,975**	**0,990**	**0,995**	**0,9995**	***v*** **P**

Гармонизированные руководства для однолабораторной валидации методов анализа (технический отчет)

(Резолюция Oeno 8/2005)

Синопсис

Валидация метода является одной из общепризнанных мер как необходимая часть комплексной системы обеспечения качества в аналитической химии. В прошлом Международная организация по стандартизации (ISO), Международный союз теоретической и прикладной химии (IUPAC) и Международная ассоциация агрохимиков (AOAC INTERNATIONAL) сотрудничали в разработке согласованных протоколов или руководств по «Проектированию, проведению и интерпретации исследования эффективности метода»[1], по «Проверке квалификации (химических) аналитических лабораторий»[2], по «Внутреннему контролю качества в аналитических химических лабораториях»[3] и по «Использованию информации об восстановлении в аналитических измерениях»[4] (из использования перекрывающихся данных в аналитических измерениях). Рабочей группе, разработавшей эти протоколы/руководства, было поручено IUPAC подготовить руководства по однолабораторной валидации методов анализа. Эти руководства дают минимальные рекомендации по проведению процедур, которые следует использовать для обеспечения валидации аналитических методов надлежащим образом.

Проект руководств обсуждался на Международном Симпозиуме по гармонизации систем обеспечения качества в химической лаборатории, материалы которого были опубликованы Королевским химическим обществом Великобритании.

По результатам Симпозиума по гармонизации систем обеспечения качества в аналитических лабораториях, Будапешт, Венгрия, 4-5 ноября 1999 г., проведенного при спонсорской поддержке IUPAC, ISO и AOAC INTERNATIONAL

СБОРНИК МЕЖДУНАРОДНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА – МОВВ
Валидация в одной лаборатории

СОДЕРЖАНИЕ

1 ВВЕДЕНИЕ
1.1 Общие сведения
1.2 Существующие протоколы, стандарты и руководства

2 ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ТЕРМИНОЛОГИЯ
2.1 Общие понятия
2.2 Определения, используемые в данном руководстве

3 Валидация метода, неопределенность и обеспечение качества

4 ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДА
4.1 Характеристика и объем валидации
4.2 Проверка предположений
4.3 Источники ошибок в анализе
4.4 Метод и лабораторные эффекты

5 Проведение валидационных исследований

6 Объем валидационных исследований
6.1 Лаборатория должна использовать «полностью» валидированный метод
6.2 Лаборатория должна использовать полностью валидированный метод, но должна применяться новая матрица
6.3 Лаборатория должна использовать хорошо зарекомендовавший себя, но совместно не изученный метод
6.4 Метод был опубликован в научной литературе с некоторыми аналитическими характеристиками
6.5 Метод был опубликован в научной литературе без указания характеристик или был разработан собственными силами
6.6 Метод является эмпирическим
6.7 Анализ «ad hoc»
6.8 Изменения в персонале и оборудовании

7 РЕКОМЕНДАЦИИ

8 БИБЛИОГРАФИЯ

OIV-MA-AS1-13 : R2005

ПРИЛОЖЕНИЕ A: ПРИМЕЧАНИЯ К ТРЕБОВАНИЯМ К ИССЛЕДОВАНИЮ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДА

A1 Применимость

A2 Селективность

A3 Калибровка и линейность
A3.1 Линейность и точка пересечения
A3.2 Тест на общий матричный эффект
A3.3 Заключительная процедура калибровки

A4 Достоверность
A4.1 Оценка достоверности
A4.2 Условия для экспериментов по определению достоверности
A4.3 Эталонные значения для экспериментов по определению достоверности
A4.3.1 Сертифицированные стандартные образцы (ССО)
A4.3.2 Справочные материалы
A4.3.3 Использование эталонного метода
A4.3.4 Пики/восстановление
A5 Точность
A6 Восстановление
A7 Диапазон концентрации
A8 Предел обнаружения
A9 Предел определения или предел количественного определения
A10 Чувствительность
A11 Надежность

A12 Пригодность для пробных целей
A13 Вариативность матрицы
A14. Погрешность измерений

ПРИЛОЖЕНИЕ B. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СООБРАЖЕНИЯ, КАСАЮЩИЕСЯ ОЦЕНКИ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ В ВАЛИДАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

B1 Анализ чувствительности
B2 Заключение

1 ВВЕДЕНИЕ

1.1 Общие сведения

Надежные аналитические методы необходимы для соблюдения национальных и международных норм во всех областях анализа. Международно признано, что лаборатория должна принимать соответствующие меры для обеспечивания того, что она способна предоставить, и предоставляет данные соответствующего качества. Такие меры включают в себя:

- использование проверенных методов анализа;
- использование внутренних процедур контроля качества;
- участие в схемах проверки квалификации;
- получение аккредитации в соответствии с международным стандартом, обычно ISO/IEC 17025.

Следует отметить, что аккредитация по ISO/IEC 17025 касается установления прослеживаемости измерений, а также требует соблюдения ряда других технических и управленческих требований, включая вышеперечисленные.

Поэтому валидация метода является важной составляющей мер, которые должна предпринять лаборатория для получения надежных аналитических данных. Прочие вышеперечисленные аспекты ранее рассматривались Межведомственной рабочей группой IUPAC по гармонизации схем обеспечения качества для аналитических лабораторий, в частности, при подготовке протоколов/руководств по (совместным) исследованиям эффективности методов[1], квалификационным испытаниям[2] и внутреннему контролю качества.[3]

В некоторых областях, в частности, анализе пищевых продуктов, требования к методам, которые были «полностью валидированы», предписаны законодательством.[5,6] « Полная» валидация аналитического метода обычно подразумевает изучение характеристик метода в ходе межлабораторного исследования эффективности метода (также известного как совместное исследование или совместное испытание). Для «полной» валидации метода анализа путем совместного испытания были разработаны международно признанные протоколы, в том числе Международный гармонизированный протокол[1] и процедура ISO.[7] Эти протоколы/стандарты

требуют включения в совместное исследование минимального количества лабораторий и материалов для испытаний для полной валидации аналитического метода. Однако не всегда практично или необходимо проводить полную валидацию аналитических методов. В таких обстоятельствах может быть целесообразна «валидация метода в одной лаборатории».

Валидация метода в одной лаборатории имеет смысл в нескольких случаях, включая следующие:

- убедиться в жизнеспособности метода до проведения дорогостоящего формального совместного испытания;
- предоставить доказательства надежности аналитических методов, если данные совместных испытаний недоступны или если проведение формального совместного испытания нецелесообразно;
- обеспечить правильное использование «готовых» валидированных методов.

Когда метод должен характеризоваться как проведенный собственными силами, важно, чтобы лаборатория определила и согласовала со своим клиентом то, какие именно характеристики должны быть оценены. Однако в ряде ситуаций эти характеристики могут быть установлены законодательством (например, остатки ветеринарных препаратов в продуктах питания и пестицидов в пищевом секторе). Объем оценки, которую проводит лаборатория, должен соответствовать требованиям законодательства.

Тем не менее, в некоторых аналитических областях один и тот же аналитический метод используется большим количеством лабораторий для определения стабильных химических соединений в определенных матрицах. Следует понимать, что если подходящий метод совместного исследования может быть доступен этим лабораториям, то затраты на совместное исследование для проверки этого метода могут быть вполне оправданы. Использование совместно изученного метода значительно сокращает усилия, которые лаборатория должна вложить в обширную работу по валидации, прежде чем использовать метод в повседневной практике. Лаборатория, использующая совместно изученный метод, который был признан подходящим для намеченной цели, должна продемонстрировать, что она может достичь характеристик, указанных в методе. Такая проверка правильности использования метода обходится гораздо дешевле, чем полная валидация в одной лаборатории. Общие затраты аналитического сообщества на валидацию конкретного

метода в рамках совместных испытаний и последующую проверку его характеристик в лабораториях, желающих его использовать, зачастую меньше, чем в случае, когда многие лаборатории самостоятельно проводят валидацию одного и того же метода.

1.2 Существующие протоколы, стандарты и руководства

Ряд протоколов и руководств[8-19] по валидации методов и неопределенности был подготовлен в первую очередь в документах AOAC INTERNATIONAL, Международной конференции по гармонизации (ICH) и документации Еврахим:

- Руководство по статистике AOAC, которое включает в себя руководство по проведению единичного лабораторного исследования перед совместным тестированием[13]
- Руководство ICH[15] и методология,[16] которые предписывают минимальные требования к валидационным исследованиям для тестов, используемых для поддержки подачи заявки на утверждение лекарственного средства.
- Соответствие аналитических методов их назначению: Лабораторное руководство по валидации методов и смежным темам (1998)[12]
- Количественная оценка неопределенности в аналитических измерениях (2000)[9]

Валидация методов также широко обсуждалась на совместной консультации экспертов ФАО/МАГАТЭ в декабре 1997 года по валидации аналитических методов для контроля пищевых продуктов, отчет о которой имеется в наличии[19].

Настоящее «Руководство» объединяет основные научные принципы вышеуказанных документов, чтобы предоставить информацию, получившую международное признание, и, что более важно, указать путь вперед для лучшей практики валидации методов в одной лаборатории.

2 ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ТЕРМОНОЛОГИЯ

2.1 Общие понятия

Термины, используемые в настоящем документе, соответствуют определениям ISO и IUPAC, где это возможно. Следующие документы содержат соответствующие определения:

i) IUPAC: Сборник химической терминологии, 1987

ii) Международный словарь основных и общих терминов в метрологии. ISO 1993

2.2 Определения, используемые в данном руководстве:

Относительная неопределенность: Неопределенность, выраженная в виде относительного стандартного отклонения.

Утвержденный диапазон: Та часть диапазона концентраций аналитического метода, которая была подвергнута валидации.

3 ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА, НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ И ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА

Для валидации метода используется набор тестов, которые проверяют любые предположения, на которых основан аналитический метод, а также устанавливают и документируют рабочие характеристики метода, тем самым демонстрируя, подходит ли метод для конкретной аналитической цели. Типичными характеристиками аналитических методов являются: применимость, селективность, калибровка, достоверность, точность, восстановление, рабочий диапазон, предел количественного определения, предел обнаружения, чувствительность и надежность. К ним можно добавить неопределенность измерения и пригодность для пробных целей.

Строго говоря, валидация должна относиться к «аналитической системе», а не к «аналитическому методу», при этом аналитическая система включает в себя определенный протокол метода, определенный диапазон концентраций аналита и определенный тип тестового материала. Для целей настоящего документа ссылка на «валидацию метода» будет рассматриваться как относящаяся к аналитической системе в целом. Если рассматривается аналитическая процедура как таковая, она будет называться «протоколом».

В данном документе валидация метода рассматривается как отличие от текущей деятельности, такой как внутренний контроль качества (IQC) или квалификационные испытания. Валидация метода проводится один раз или через относительно редкие промежутки времени в течение срока службы метода; она сообщает нам, каких результатов мы можем ожидать от метода в будущем. Внутренний контроль качества говорит нам о том, как метод показал себя в прошлом. Поэтому IQC рассматривается как отдельный вид деятельности в программе гармонизации IUPAC.[3]

При валидации метода представляющие интерес количественные характеристики относятся к точности результата, который может быть получен. Поэтому в целом верно утверждение, что валидация метода равносильна задаче оценки неопределенности измерения. За прошедшие годы стало традиционным для целей валидации

представлять различные аспекты эффективности метода путем ссылки на отдельные пункты, перечисленные выше, и в значительной степени данное руководство отражает эту схему. Однако в связи с растущей зависимостью от неопределенности измерений как ключевого показателя как пригодности к применению, так и надежности результатов, химики-аналитики будут все чаще проводить валидацию измерений для поддержки оценки неопределенности, а некоторые специалисты-практики захотят сделать это немедленно. Соответственно, неопределенность измерений кратко рассматривается в Приложении A как характеристика эффективности аналитического метода, а Приложение B содержит дополнительные указания по некоторым процедурам, не охваченным иным образом.

4 ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДОВ

4.1 Спецификация и объем валидации

Валидация применяется к определенному протоколу для определения конкретного аналита и диапазона концентраций в конкретном типе тестового материала, используемого для определенной цели. В целом, валидация должна проверить, что метод работает надлежащим образом для данной цели во всем диапазоне концентраций аналитов и испытательных материалов, к которым он применяется. Из этого следует, что эти характеристики вместе с изложением любых критериев пригодности метода для конкретной цели должны быть полностью определены до проведения валидации.

4.2 Предположения при тестировании

В дополнение к предоставлению показателей эффективности, которые указывают на пригодность к применению и стали доминировать в практическом использовании валидационных данных, валидационные исследования выступают в качестве объективной проверки любых предположений, на которых основан аналитический метод. Например, если результат должен быть рассчитан по простой прямой калибровочной функции, неявно предполагается, что анализ свободен от значительного смещения, что отклик пропорционален концентрации аналита, и что дисперсия случайных ошибок постоянна во всем интересующем диапазоне. В большинстве случаев такие предположения делаются на основе опыта, накопленного при разработке метода или в течение длительного времени, и, следовательно, являются достаточно надежными. Тем не менее, хорошая наука об измерениях опирается на *проверенные* гипотезы. Именно по этой причине так много валидационных исследований основано на статистической проверке гипотез; цель состоит в том, чтобы обеспечить базовую проверку того, что разумные предположения, сделанные относительно принципов метода, не являются серьезно ошибочными.

Это, на первый взгляд, непонятное замечание имеет важное практическое значение. Проще проверить грубое отклонение от надежного предположения, чем ‘доказать' правильность конкретного предположения. Таким образом, при наличии длительной практики

успешного использования конкретной аналитической методики (например, газохроматографического анализа или метода кислотного переваривания) для ряда аналитов и матриц, проверки валидации вполне оправданно принимают форму относительно легких предупредительных тестов. И наоборот, если опыт невелик, валидационное исследование должно предоставить убедительные доказательства того, что сделанные допущения подходят для конкретных исследуемых случаев и необходимо детально изучить весь спектр обстоятельств. Из этого следует, что объем валидационных исследований, необходимых в конкретном случае, будет частично зависеть от накопленного опыта используемого аналитического метода.

В последующем обсуждении будет считаться само собой разумеющимся, что лаборатория хорошо отработала интересующую методику и что целью любых проверок значимости является проверка того, что нет веских доказательств, чтобы отказаться от предположений, на которые опирается конкретный протокол. Читатель должен помнить, что для незнакомых или менее устоявшихся методик измерения могут потребоваться более строгие проверки.

4.3 Источники ошибок в анализе

Ошибки в аналитических измерениях возникают из разных источников* и на разных уровнях организации. Один из полезных способов представления этих источников (для конкретной концентрации аналита) выглядит следующим образом[+24]:

- случайная погрешность измерения (повторяемость);
- погрешность прогона;
- лабораторная погрешность;
- погрешность метода;
- эффект изменения матрицы.

Хотя эти различные источники не обязательно могут быть независимыми, данный список дает возможность проверить, насколько данное валидационное исследование учитывает источники ошибок.
Понятие повторяемости (в пределах цикла) включает вклад любой части процедуры, которая изменяется в пределах цикла, в том числе вклад

привычных гравиметрических и объемных ошибок, неоднородности испытуемого материала и вариативности на этапах химической обработки анализа, и это легко увидеть в дисперсии воспроизведенных анализов. Эффект прогона учитывает дополнительные ежедневные колебания в аналитической системе, такие как смена аналитика, партии реагентов, перекалибровка приборов и лабораторная среда (например, изменения температуры). При проверке в одной лаборатории эффект прогона обычно оценивается путем проведения спланированного эксперимента с воспроизведением анализа соответствующего материала в нескольких отдельных прогонах.

[*] Неопределенность выборки в строгом смысле неопределенности, связанной с подготовкой лабораторной пробы из объемной цели, исключена из рассмотрения в данном документе. Неопределенность, связанная с отбором тестовой порции из лабораторного образца, является неотъемлемой частью неопределенности измерений и автоматически включается на различных уровнях последующего анализа.

[+] Возможно множество альтернативных группировок или «разделов погрешности», которые могут быть полезны при более детальном изучении конкретных источников погрешности или в различных ситуациях. Например, статистическая модель ISO 5725, как правило, объединяет лабораторные и прогонные эффекты, тогда как процедура оценки неопределенности в ISO GUM хорошо подходит для оценки влияния каждого отдельного и измеримого влияния на результат.

Межлабораторная вариативность возникает в результате таких факторов, как различия в калибровочных стандартах, различия между местными интерпретациями протокола, изменения в оборудовании или источнике реагентов или факторов окружающей среды, таких как различия в средних климатических условиях. Межлабораторная вариативность четко прослеживается как реальность в результатах совместных испытаний (исследований эффективности методов) и квалификационных испытаний, а межметодная вариативность иногда может быть обнаружена в результатах последних.

Как правило, повторяемость, эффект прогона и лабораторный эффект сопоставимы по величине, поэтому ни один из них нельзя игнорировать при валидации. В прошлом существовала тенденция пренебрежения этими аспектами, особенно при оценке и представлении информации о неопределенности. Это приводит к слишком узким интервалам неопределенности. Например, совместные испытания в том виде, в котором они обычно проводятся, не дают полной картины, поскольку вклад в неопределенность от смещения метода и вариативности матрицы не оценивается в совместных испытаниях и должен рассматриваться отдельно (обычно в предварительном однолабораторном исследовании). При валидации в одной лаборатории существует особая опасность того, что лабораторная погрешность также может быть упущена из виду, а этот пункт обычно является самым большим вкладом в неопределенность из приведенного выше списка. Поэтому при валидации в одной лаборатории необходимо уделять особое внимание лабораторной погрешности.

В дополнение к вышеупомянутым проблемам, валидация метода ограничена областью его применения, то есть метод применяется к определенному классу испытуемого материала. Если существует значительная вариативность типов матриц в пределах определенного класса, возникает дополнительный источник вариативности из-за внутриклассовых матричных эффектов. Конечно, если метод впоследствии используется для материалов, не относящихся к определенному классу (то есть вне области валидации), аналитическая система не может считаться валидированной: в процесс измерения вносится дополнительная ошибка неизвестной величины.

Аналитикам также важно учитывать то, как эффективность метода меняется в зависимости от концентрации аналита. В большинстве

случаев дисперсия результатов абсолютно увеличивается с ростом концентрации, а восстановление может существенно отличаться при высоких и низких концентрациях. Поэтому неопределенность измерения, связанная с результатами, часто зависит как от этих эффектов, так и от других факторов, зависящих от концентрации. К счастью, часто разумно предположить простую зависимость между результатами и концентрацией аналита; чаще всего ошибки пропорциональны концентрации аналита.* Однако, если эффективность метода представляет интерес при значительно отличающихся концентрациях, важно проверить предполагаемую зависимость между эффективностью и концентрацией аналита. Обычно это делается путем проверки эффективности на крайних значениях вероятного диапазона или на нескольких выбранных уровнях. Проверки линейности также предоставляют информацию такого же рода.

* Это может быть неприменимо при концентрациях, менее чем в 10 раз превышающих предел обнаружения.

4.4 Метод и лабораторные эффекты

При валидации метода в одной лаборатории крайне важно учитывать погрешность метода и погрешность лаборатории. Есть несколько лабораторий со специальным оборудованием, где эти погрешности можно считать незначительными, но это обстоятельство является полностью исключительным. (Однако, если конкретный анализ проводит только одна лаборатория, то погрешность метода и погрешность лаборатории приобретают другой смысл). Обычно эффекты метода и лаборатории должны быть включены в бюджет неопределенности, но часто их труднее учесть, чем ошибку повторяемости и эффект прогона. В целом, для оценки соответствующих неопределенностей необходимо использовать информацию, собранную независимо от лаборатории. Наиболее полезными источниками такой информации являются (i) статистика совместных испытаний (недоступная во многих ситуациях валидации метода в одной лаборатории), (ii) статистика квалификационных испытаний и (iii) результаты анализа сертифицированных стандартных образцов.

Совместные испытания напрямую оценивают дисперсию межлабораторных погрешностей. Несмотря на возможные теоретические недостатки в разработке таких испытаний, эти оценки дисперсии подходят для многих практических целей. Следовательно, всегда полезно проверить валидацию в одной лаборатории, сравнивая оценки неопределенности с оценками воспроизводимости, полученными в совместных испытаниях. Если результат, полученный в одной лаборатории, существенно меньше, вероятно, что важные источники неопределенности были проигнорированы. (В качестве альтернативы может оказаться, что конкретная лаборатория на самом деле работает с меньшей неопределенностью, чем в совместных испытаниях: такой лаборатории придется принять особые меры, чтобы обосновать такое утверждение). Если совместные испытания конкретного метода/комбинации испытательных материалов не проводились, оценку стандартного отклонения воспроизводимости $\square_H$ при концентрации аналита c выше 120 млрд$^{-1}$ обычно можно получить из функции Горвица, $\sigma_H = 0.02c^{0.8495}$, при этом обе переменные выражаются как массовые доли. (Оценка Горвица обычно находится в пределах примерно двух факторов от наблюдаемых результатов

совместных исследований). Было замечено, что функция Горвица является неверной при концентрациях ниже, чем около 120 млрд$^{-1}$, и более подходящей является модифицированная функция.[21, 25] Вся эта информация может быть перенесена в зону одной лаборатории с минимальными изменениями.

Статистика, полученная в ходе квалификационных испытаний, особенно интересна, поскольку она предоставляет информацию в целом о величине погрешностей лаборатории и метода вместе взятых и, для участника, информацию об общей ошибке в конкретных случаях. Такие статистические данные, как устойчивое стандартное отклонение результатов участников по аналиту в раунде теста, в принципе, могут быть использованы аналогично стандартным отклонениям воспроизводимости в совместных испытаниях, т.е. для получения эталона общей неопределенности для сравнения с индивидуальными оценками, полученными при валидации в одной лаборатории. На практике доступ к статистическим данным, полученным в ходе квалификационных испытаний, может быть более затруднен, поскольку они не систематизируются и не публикуются, как результаты совместных испытаний, а предоставляются только участникам. Конечно, если такая статистика должна быть использована, она должна относиться к соответствующей матрице и концентрации аналита. Отдельные участники схем проверки квалификации также могут оценить достоверность своей оценочной неопределенности, сравнивая свои заявленные результаты с установленными значениями в последовательных раундах[6]. Однако это постоянная деятельность, и поэтому она не входит в компетенцию валидации одной лаборатории (которая является разовым мероприятием).

Если имеется соответствующий сертифицированный стандартный образец, однолабораторный тест позволяет лаборатории оценить лабораторную погрешность и погрешность метода в сочетании, анализируя данный стандартный образец несколько раз. Оценка комбинированной погрешности представляет собой разницу между средним результатом и сертифицированным значением.
Соответствующие сертифицированные стандартные образцы не всегда доступны, поэтому приходится использовать другие материалы. Материалы, оставшиеся после квалификационных испытаний, иногда служат для этой цели, и, хотя установленные значения этих материалов могут иметь сомнительную неопределенность, их использование, безусловно, обеспечивает проверку общей погрешности. В частности,

приписанные значения в квалификационных тестах обычно выбираются так, чтобы обеспечить минимально смещенную оценку, поэтому проверка на значительное смещение в отношении такого материала является разумной практикой. Другой альтернативой является использование информации о пиковых значениях и восстановлении[4] для получения оценок этих смещений, хотя могут существовать неизмеримые источники неопределенности, связанные с этими методами.

В настоящее время наименее признанным эффектом при валидации является эффект, обусловленный вариативностью матрицы в пределах определенного класса испытуемого материала. Теоретическое требование для оценки этого компонента неопределенности заключается в том, чтобы репрезентативная коллекция испытательных материалов была проанализирована в одном цикле, оценены их индивидуальные смещения и рассчитана дисперсия этих смещений. (Анализ в одном цикле означает, что смещения более высокого уровня не влияют на дисперсию. Если имеется широкий диапазон концентраций, то необходимо сделать поправку на изменение смещения в зависимости от концентрации). Если репрезентативные материалы являются сертифицированными эталонными материалами, погрешности могут быть оценены непосредственно как разница между результатами и эталонными значениями, и вся процедура является простой. В более вероятном случае, когда сертифицированных эталонных материалов недостаточно, можно прибегнуть к испытаниям на восстановление с использованием ряда типичных тестовых материалов, но с должной осторожностью.

В настоящее время имеется очень мало количественной информации о величине неопределенностей из этого источника, хотя в некоторых случаях предполагается, что они велики.

5 Проведение валидационных исследований

Детальная разработка и проведение исследований по валидации методов подробно описаны в других источниках и здесь не будут повторяться. Однако основные принципы являются актуальными и рассматриваются ниже:

Очень важно, чтобы валидационные исследования были репрезентативными. То есть, исследования должны, насколько это возможно, проводиться для обеспечения реалистичного обзора количества и диапазона эффектов, действующих при нормальном использовании метода, а также для охвата диапазонов концентраций и типов проб, входящих в область применения метода. Например, если фактор (такой как температура окружающей среды) изменяется случайным образом в ходе прецизионного эксперимента, влияние этого фактора проявляется непосредственно в наблюдаемой дисперсии и не требует дополнительного изучения, если только не требуется дальнейшая оптимизация метода.

В контексте валидации метода «репрезентативная вариативность» означает, что фактор должен принимать распределение значений, соответствующее предполагаемому диапазону рассматриваемого параметра. Для непрерывных измеряемых параметров это может быть допустимый диапазон, установленная неопределенность или ожидаемый диапазон; для прерывных факторов или факторов с непредсказуемыми эффектами, таких как матрица образца, репрезентативный диапазон соответствует разнообразию типов или «уровней факторов», допустимых или встречающихся при нормальном использовании метода. В идеале репрезентативность распространяется не только на диапазон значений, но и на их распределение. К сожалению, часто бывает нерентабельно организовывать полное варьирование многих факторов на многих уровнях. Однако для большинства практических целей испытания, основанные на крайних значениях ожидаемого диапазона или на более значительных изменениях, чем предполагалось, являются приемлемым минимумом.

При выборе факторов вариативности важно обеспечить максимальную «отработку» больших эффектов. Например, если вариативности изо дня в день (возможно, возникающие из-за эффектов перекалибровки) значительны по сравнению с повторяемостью, два определения в каждый из пяти дней дадут лучшую оценку промежуточной точности, чем пять определений в каждый из двух дней. Десять отдельных определений в отдельные дни будут еще лучше, при условии достаточного контроля, хотя это не даст дополнительной информации о повторяемости в течение дня.

Очевидно, что при планировании проверок значимости любое исследование должно обладать достаточной мощностью для обнаружения таких эффектов до того, как они станут практически значимыми (то есть, сравнимыми с наибольшим компонентом неопределенности).

Кроме того, могут быть важны следующие соображения:

- Если известно или предполагается, что факторы взаимодействуют, важно обеспечить учет эффекта взаимодействия. Это может быть достигнуто либо путем обеспечения случайного выбора из различных уровней взаимодействующих параметров, либо путем тщательного систематического проектирования для получения эффектов взаимодействия или информации о ковариативности.
- При проведении исследований общей погрешности важно, чтобы эталонные материалы и значения относились к материалам, подвергаемым обычному испытанию.

6 Объем валидационных исследований

Степень, в которой лаборатория должна проводить валидацию нового, модифицированного или незнакомого метода, в определенной степени зависит от существующего статуса метода и компетентности лаборатории. Ниже приведены предложения по объему валидации и верификации для различных обстоятельств. За исключением случаев, когда это указано, предполагается, что метод предназначен для рутинного использования.

6.1 Лаборатория должна использовать «полностью» валидированный метод

Метод был изучен в совместном испытании, поэтому лаборатория должна убедиться, что она способна достичь опубликованных характеристик метода (или иным образом выполнить требования аналитической задачи). Лаборатория должна провести исследования прецизионности, погрешности (включая исследования вариативности матрицы) и, возможно, исследования линейности, хотя некоторые испытания, например, на надежность, могут быть опущены.

6.2 Лаборатория должна использовать полностью валидированный метод, но необходимо использовать новую матрицу

Метод был изучен в совместном испытании, поэтому лаборатория должна убедиться, что новая матрица не вносит новых источников ошибок в систему. Требуется тот же диапазон валидации, что и в предыдущем случае.

6.3 Лаборатория должна использовать хорошо зарекомендовавший себя, но не изученный совместными усилиями метод

Необходим тот же диапазон проверки, что и в предыдущем случае.

6.4 Метод был опубликован в научной литературе вместе с некоторыми аналитическими характеристиками

Лаборатория должна провести исследования прецизионности, погрешности (включая исследования вариативности матрицы), надежности и линейности.

6.5 Метод опубликован в научной литературе без указания характеристик или разработан собственными силами

Лаборатория должна провести исследования прецизионности, погрешности (включая исследования вариативности матрицы), надежности и линейности.

6.6 Метод является эмпирическим

Эмпирический метод - это метод, в котором оцениваемая величина является просто результатом, полученным при выполнении указанной процедуры. Это отличается от измерений, предназначенных для оценки независимых от метода величин, таких как концентрация конкретного аналита в образце, тем, что погрешность метода условно равна нулю, а вариативность матрицы (то есть в пределах определенного класса) не имеет значения. Лабораторную погрешность нельзя игнорировать, но ее, скорее всего, трудно оценить с помощью эксперимента в одной

лаборатории. Более того, эталонные материалы вряд ли будут доступны. В отсутствие данных совместных испытаний некоторую оценку межлабораторной точности можно получить из специально разработанного исследования надежности или оценить с помощью функции Хорвица.

6.7 Анализ «ad hoc»

Анализ «ad hoc» иногда необходим для определения общего диапазона значений, без больших затрат и с низкой критичностью. Соответственно, усилия, которые могут быть направлены на валидацию, строго ограничены. Погрешность должна изучаться такими методами, как оценка восстановления или добавление аналитов, а точность - путем повторения.

6.8 Изменения персонала и оборудования

Важные примеры включают: изменение основных приборов; новые партии очень изменчивых реагентов (например, поликлональных антител); изменения в помещениях лаборатории; методы, впервые используемые новым персоналом; или валидированный метод, используемый после периода неиспользования. В этом случае необходимо продемонстрировать, что не произошло никаких пагубных изменений. Минимальной проверкой является однократное испытание на погрешность; эксперимент «до и после» на типичных тестовых или контрольных материалах. В целом, проведенные испытания должны отражать возможное влияние изменения на аналитическую процедуру.

7 РЕКОМЕНДАЦИИ

В отношении использования валидации метода в одной лаборатории даны следующие рекомендации:

- Там, где это возможно и целесообразно, лаборатория должна использовать метод анализа, характеристики которого были оценены в ходе совместных испытаний в соответствии с международным протоколом.
- Если такие методы недоступны, то перед использованием для получения аналитических данных для клиента необходимо провести валидацию метода на собственном предприятии.
-

- Валидация в одной лаборатории требует от лаборатории выбора соответствующих характеристик для оценки из следующих: применимость, селективность, калибровка, точность, прецизионность, диапазон, предел количественного определения, предел обнаружения, чувствительность, надежность и целесообразность. Лаборатория должна учитывать требования заказчика при выборе характеристик для определения.
- Свидетельства того, что эти характеристики были оценены, должны быть доступны клиентам лаборатории, если это требуется заказчику.

8 БИБЛИОГРАФИЯ

1. *"Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies"*, W Horwitz, *Pure Appl. Chem*., 1988, **60**, 855 864, revised W. Horwitz, *Pure Appl. Chem.,* 1995, **67**, 331-343.

2. *"The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories",* M Thompson and R Wood, *Pure Appl. Chem.,* 1993, **65**, 2123-2144. (Also published in *J. AOAC International*, 1993, **76**, 926-940.

3. *"Harmonised Guidelines For Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories"*, Michael Thompson and Roger Wood, J. Pure & Applied Chemistry, 1995, 67(4), 49-56.

4. *"Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement",* Michael Thompson, Stephen Ellison, Ales Fajgelj, Paul Willetts and Roger Wood, J. Pure & Applied Chemistry, 1999, 71(2), 337-348.

5. *"Council Directive 93/99/EEC on the Subject of Additional Measures Concerning the Official Control of Foodstuffs"*, O. J., 1993, L290.

6. *"Procedural Manual of the Codex Alimentarius Commission, 10th Edition"*, FAO, Rome, 1997.

7. "*Precision of Test Methods"*, Geneva, 1994, ISO 5725, Previous editions were issued in 1981 and 1986.

8. *"Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement"*, ISO, Geneva,1993.

9. *"Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement"*, EURACHEM Secretariat, Laboratory of the Government Chemist, Teddington, UK, 1995, EURACHEM Guide (under revision).

10. *"International vocabulary of basic and general terms in metrology"* ISO, Geneva 1993

11. *"Validation of Chemical Analytical Methods"*, NMKL Secretariat, Finland, 1996, NMKL Procedure No. 4.

12. *"EURACHEM Guide: The fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to method validation and related topics"*, LGC, Teddington 1996. Also available from the EURACHEM Secretariat and website.

13. *"Statistics manual of the AOAC"*, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, Maryland, USA, 1975

14. *"An Interlaboratory Analytical Method Validation Short Course developed by the AOAC INTERNATIONAL"*, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, Maryland, USA, 1996.

15. *"Text on validation of analytical procedures"* International Conference on Harmonisation. Federal Register, Vol. 60, March 1, 1995, pages 11260

16. *"Validation of analytical procedures: Methodology"* International Conference on Harmonisation. Federal Register, Vol. 62, No. 96, May 19, 1997, pages 27463-27467.

17. *"Validation of Methods"*, Inspectorate for Health Protection, Rijswijk, The Netherlands, Report 95-001.

18. *"A Protocol for Analytical Quality Assurance in Public Analysts' Laboratories"*, Association of Public Analysts, 342 Coleford Road, Sheffield S9 5PH, UK, 1986.

19. *"Validation of Analytical Methods for Food Control"*, Report of a Joint FAO/IAEA Expert Consultation, December 1997, FAO Food and Nutrition Paper No. 68, FAO, Rome, 1998

20. *"Estimation and Expression of Measurement Uncertainty in Chemical Analysis"*, NMKL Secretariat, Finland, 1997, NMKL Procedure No. 5.

21. M Thompson, PJ Lowthian, *J AOAC Int*, 1997, **80**, 676-679

22. IUPAC recommendation: *"Nomenclature in evaluation of analytical methods, including quantification and detection capabilities" Pure and Applied Chem."* 1995, **67** 1699-1723

23. ISO 11843. "*Capability of detection*." (Several parts). International Standards Organisation, Geneva.

24. M. Thompson, *Analyst*, 2000, **125**, 2020-2025

25. *"Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppbconcentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing"* M Thompson, *Analyst*, 2000, **125**, 385-386.

26. *"How to combine proficiency test results with your own uncertainty estimate - the zeta score"*, Analytical Methods Committee of the Royal Society of Chemistry, AMC Technical Briefs, editor M. Thompson, *AMC Technical Brief No. 2, www.rsc.org/lap/rsccom/amc*

ПРИЛОЖЕНИЕ A: Примечания по требованиям к исследованию характеристик эффективности метода

Общие требования к отдельным рабочим характеристикам для метода следующие.

A1 Применимость

После валидации документация должна содержать, в дополнение к любой спецификации характеристик, следующую информацию:

- идентичность аналита, включая, при необходимости, видовую принадлежность (Пример: «общий мышьяк»);
- диапазон концентраций, охватываемый проверкой (пример: «0-50 млн$^{-1}$»);
- спецификация диапазона матриц тестового материала, охватываемого валидацией (Пример: «морепродукты»);
- протокол, описывающий оборудование, реагенты, процедуру (включая допустимые отклонения в указанных инструкциях, например, «нагревание при 100 ± 5° в течение 30 ± 5 минут»), процедуры калибровки и контроля качества, а также любые специальные меры безопасности, необходимые для проведения анализа. необходимые меры предосторожности;
- предполагаемое применение и требования к критической неопределенности (Пример: «Анализ пищевых продуктов для целей скрининга. Стандартная неопределенность $u(c)$ результата c должна быть менее 0,1x c»).

A2 Селективность

Селективность - это степень, в которой метод может точно количественно определить аналит в присутствии мешающих факторов. В идеале селективность должна быть оценена для любого важного интерферента, который может присутствовать. Особенно важно проверить интерференты, которые, по химическим принципам, вероятно, будут реагировать на тест. Например, при проведении колориметрического теста на аммиак можно обоснованно ожидать, что он будет реагировать на первичные алифатические амины. Может оказаться невозможным рассмотреть или протестировать каждый потенциальный интерферент; в этом случае рекомендуется проверять

вероятные наихудшие случаи. Как правило, селективность должна быть достаточно высокой, чтобы можно было игнорировать любые интерференции.

Во многих видах анализа селективность - это, по сути, качественная оценка, основанная на значимости или не значимости подходящих тестов на интерференцию. Однако существуют полезные количественные показатели. В частности, одним из количественных показателей является индекс селективности b_{an}/b_{int}, где b_{an} - чувствительность метода (наклон калибровочной функции), а b_{int} - наклон отклика, независимо вызванного потенциальным интерферирующим веществом, обеспечивает количественную меру интерференции. b_{int} может быть определен приблизительно путем выполнения процедуры на матричной заготовке и той же заготовке, пропитанной потенциальным интерферирующим веществом в одной соответствующей концентрации. Если матричная заготовка недоступна, и вместо нее используется типичный материал, b_{int} может быть оценен из такого простого эксперимента только в предположении, что взаимные эффекты матрицы отсутствуют. Обращают внимание, что b_{int} легче определить в отсутствие аналита, поскольку этот эффект можно спутать с другим типом интерференции, когда чувствительность аналита сама подвержена влиянию интерференции (матричный эффект).

A3 Калибровка и линейность

За исключением грубых ошибок при подготовке калибровочных материалов, ошибки калибровки обычно (но не всегда) являются незначительным компонентом общего бюджета неопределенности, и обычно могут быть безопасно включены в различные категории, оцениваемые методами «сверху вниз». Например, случайные ошибки, возникающие в результате калибровки, являются частью прогрешности прогона, которая оценивается в целом, в то время как систематические ошибки из этого источника могут проявляться как погрешности лаборатории, которые также оцениваются в целом. Тем не менее, существуют некоторые характеристики калибровки, которые полезно знать на начальном этапе валидации метода, поскольку они влияют на стратегию оптимального развития процедуры. К этому классу относятся такие вопросы, как: является ли калибровочная функция правдоподобно (a) линейной, (b) проходит через начало координат и (c) не зависит от матрицы испытуемого материала. Описанные здесь

процедуры относятся к калибровочным исследованиям при валидации, которые неизбежно являются более строгими, чем калибровка, проводимая в ходе обычного анализа. Например, если при валидации установлено, что калибровочная функция линейна и проходит через начало координат, то для повседневного использования можно использовать гораздо более простую стратегию калибровки (например, двухточечную повторную модель). Ошибки от этой более простой стратегии калибровки обычно включаются в ошибки более высокого уровня для целей валидации.

A3.1 Линейность и точка пересечения

Линейность можно проверить неформально, изучив график остатков, полученных в результате линейной регрессии откликов на концентрации в соответствующем калибровочном наборе. Любой искривленный график указывает на отсутствие соответствия из-за нелинейной калибровочной функции. Проверка значимости может быть проведена путем сравнения дисперсии отсутствия соответствия с дисперсией, обусловленной чистой ошибкой. Однако существуют и другие причины отсутствия соответствия, кроме нелинейности, которые могут возникать в некоторых видах аналитической калибровки, поэтому тест на значимость должен использоваться в сочетании с графиком остатков. Несмотря на широкое использование в настоящее время в качестве показателя качества соответствия, коэффициент корреляции вводит в заблуждение, и не подходит в качестве теста на линейность, и не должен использоваться.

Проектирование имеет огромное значение в тестах на отсутствие соответствия, поскольку легко спутать нелинейность с дрейфом. Повторные измерения необходимы для получения оценки чистой ошибки, если нет независимой оценки. При отсутствии конкретных указаний следует руководствоваться следующим:

- должно быть шесть или более калибраторов;
- калибраторы должны быть равномерно распределены по интересующему диапазону концентраций;
- диапазон должен охватывать 0-150% или 50-150% от концентрации, которая может встретиться, в зависимости от того, какой из этих вариантов является более подходящим;
- калибраторы должны проводиться как минимум в двух экземплярах, а лучше в трех или более, в случайном порядке.

После исследовательской подгонки с помощью простой линейной регрессии остатки следует проверить на наличие очевидных закономерностей. Гетероскедастичность довольно часто встречается в аналитической калибровке, и наличие такой закономерности означает, что данные калибровки лучше всего обрабатывать взвешенной регрессией. Неиспользование взвешенной регрессии в таких обстоятельствах может привести к преувеличенным ошибкам на низком конце калибровочной функции.

Тест на отсутствие соответствия может быть проведен с помощью простой или взвешенной регрессии. Тест на наличие точек пересечения a, значительно отличающегося от нуля, также может быть проведен на этих данных, если нет значительного отсутствия соответствия.

A3.2 Тест на общий эффект матрицы

Калибровка значительно упрощается, если калибраторы могут быть приготовлены в виде простого раствора аналита. Влияние возможного общего несоответствия матрицы должно быть оценено при валидации, если принята эта стратегия. Тест на эффект общей матрицы может быть проведен путем применения метода добавок аналита (также называемых «стандартными добавками») к тестовому раствору, полученному из типичного тестового материала. Тест должен быть проведен таким образом, чтобы обеспечить такое же конечное разбавление, какое получается при обычной процедуре, а диапазон добавок должен охватывать тот же диапазон, что и определенная процедурой калибровочная валидация. Если калибровка линейна, то наклоны обычной калибровочной функции и графика добавок аналита можно сравнить на предмет существенной разницы. Отсутствие значимости означает отсутствие обнаруживаемого общего эффекта матрицы. Если калибровка не линейна, для проверки значимости необходим более сложный метод, но обычно достаточно визуального сравнения при равных концентрациях. Отсутствие значимости в этом тесте часто означает, что матричный эффект вариативности [Раздел A13] также будет отсутствовать.

A3.3 Процедура окончательной калибровки

Стратегия калибровки, указанная в процедуре, может также нуждаться в отдельной валидации, хотя соответствующие ошибки будут вносить

вклад в совместно оцениваемые неопределенности. Важным моментом здесь является то, что неопределенность оценки, полученная из конкретных разработок для линейности и т.д., будет меньше, чем неопределенность, полученная из более простой калибровки, определенной в протоколе процедуры.

A4 Достоверность

A4.1 Оценка достоверности

Достоверность - это близость согласия между результатом испытания и принятым эталонным значением измеряемого свойства. Достоверность определяется количественно в терминах «погрешности»; при этом меньшая погрешность указывает на большую достоверность. Погрешность обычно определяется путем сравнения реакции метода на эталонный материал с известным значением, присвоенным материалу. Рекомендуется проводить тестирование на значимость. Если неопределенность эталонного значения не является пренебрежимо малой, при оценке результатов следует учитывать неопределенность эталонного материала, а также статистическую изменчивость.

A4.2 Условия для проведения экспериментов на достоверность

Погрешность может возникать на разных уровнях организации аналитической системы, например, погрешность прогона, погрешность лаборатории и погрешность метода. Важно помнить, какие из них рассматриваются различными методами борьбы с погрешностью:

- Среднее значение серии анализов стандартного образца, выполненных полностью в рамках одного прогона, дает информацию о сумме влияния метода, лаборатории и эффекта прогона для данного конкретного прогона. Поскольку предполагается, что влияние прогона является случайным от прогона к прогону, результат будет отличаться от прогона к прогону больше, чем можно было бы ожидать по наблюдаемой дисперсии результатов, и это необходимо учитывать при оценке результатов (например, проверяя измеренное смещение против стандартного отклонения между прогонами, исследуемого отдельно).

- Среднее значение повторных анализов стандартного образца в серии прогонов оценивает совместное влияние погрешностей метода и л

  лаборатории в данной лаборатории (за исключением случаев, когда значение присваивается с использованием конкретного метода).

A4.3 Эталонные значения для экспериментов по проверке достоверности

A4.3.1 Сертифицированные стандартные образцы (ССО)

ССО прослеживаются до международных стандартов с известной неопределенностью и поэтому могут быть использованы для одновременного рассмотрения всех аспектов погрешности (метод, лаборатория и внутри лаборатории), при условии отсутствия матричного несоответствия. Соответственно, ССО следует использовать при валидации достоверности там, где это практически возможно. Важно убедиться, что неопределенности аттестованных значений достаточно малы, чтобы позволить обнаружить погрешность значительной величины. Если это не так, использование ССО по-прежнему рекомендуется, но при этом следует провести дополнительные проверки.

Типичный эксперимент по проверке достоверности генерирует средний отклик на эталонном материале. При интерпретации результата следует учитывать неопределенность, связанную с сертифицированным значением, а также неопределенность, возникающую из-за статистической вариативности в лаборатории. Последний термин может быть основан на внутрилабораторном, межлабораторном или оценке межлабораторного стандартного отклонения в зависимости от цели эксперимента. Статистические или материальные. Если неопределенность сертифицированного значения мала, обычно проводится *t*-тест Стьюдента с использованием соответствующего определения точности.

Там, где это необходимо и практически осуществимо, следует исследовать ряд подходящих ССО, с соответствующими матрицами и концентрациями аналитов. Если это сделано, и неопределенность аттестованных значений меньше, чем неопределенность результатов анализа, то для оценки результатов достаточно безопасно использовать простую регрессию. Таким образом, погрешность может быть выражена

как функция концентрации и может проявляться как ненулевая точка пересечения («переходная» или постоянная погрешность) или как

неединичный наклон («вращательная» или пропорциональная погрешность). При интерпретации результатов следует проявлять осторожность, если диапазон матриц велике.

4.3.2 Справочные материалы

При отсутствии ССО или в качестве дополнения к ССО можно использовать любой материал, достаточно хорошо характеризующийся для данной цели (эталонный материал[10]), всегда помня, что хотя незначительная погрешность не может быть доказательством нулевой погрешности, значительная погрешность любого материала остается поводом для расследования. Примеры эталонных материалов включают: материалы, характеризуемые производителем эталонного материала, но значения которых не сопровождаются заявлением о неопределенности или иным образом квалифицированы; материалы, характеризуемые производителем материалы, характеризуемые производителем стандартного материала; материалы, характеризуемые в лаборатории для использования в качестве стандартных материалов; материалы, подвергнутые ограниченному круговому испытанию или распределенные в ходе квалификационного испытания. Хотя прослеживаемость этих материалов может быть сомнительной, гораздо лучше использовать их, чем вообще не проводить оценку на предмет погрешности. Эти материалы будут использоваться точно так же, как и ССО, хотя при отсутствии заявленной неопределенности любая проверка значимости полностью полагается на наблюдаемую точность результатов.

А4.3.3 Использование эталонного метода

Эталонный метод в принципе может быть использован для проверки погрешности другого валидируемого метода. Это полезный вариант при проверке альтернативы или модификации установленного стандартного метода, уже валидированного и используемого в лаборатории. Оба метода используются для анализа ряда типичных тестовых материалов, предпочтительно равномерно охватывающих полезный диапазон концентраций. Сравнение результатов в этом диапазоне с помощью подходящего статистического метода (например, парного *t*-теста, с

надлежащей проверкой на однородность дисперсии и нормальность) продемонстрирует любые отклонения между методами.

A4.3.4 Использование добавок /восстановления

При отсутствии стандартных образцов или для поддержки исследований стандартных образцов погрешность может быть исследована с помощью добавок и восстановления. Типичный тестовый материал анализируется валидируемым методом как в исходном состоянии, так и после добавления к тестовой порции известной массы аналита. Разница между двумя результатами в долях от добавленной массы называется суррогатным восстановлением или иногда предельным восстановлением. Восстановление, значительно отличающееся от единицы, указывает на то, что на метод влияет погрешность. Строго говоря, исследования восстановления, описанные здесь, оценивают погрешность только из-за эффектов, действующих на добавленный аналит; те же эффекты не обязательно действуют в той же степени на родной аналит, а на родной аналит могут действовать дополнительные эффекты. Соответственно, исследования пика/восстановления очень сильно зависят от замечания, что в то время как хорошее восстановление не является гарантией достоверности, плохое восстановление определенно указывает на отсутствие достоверности. Методы обработки данных по добавкам/восстановлению были подробно рассмотрены в других разделах.[4]

A5 Точность

Точность - это близость между независимыми результатами испытаний, полученными в оговоренных условиях. Она обычно указывается в терминах стандартного отклонения или относительного стандартного отклонения. Различие между точностью и погрешностью является фундаментальным, но зависит от уровня, на котором рассматривается аналитическая система. Так, с точки зрения единичного определения, любое отклонение, влияющее на калибровку для данного цикла, будет рассматриваться как погрешность. С точки зрения аналитика, анализирующего работу за год, погрешность прогона будет отличаться каждый день и действовать как случайная переменная с

соответствующей точностью. Оговоренные условия для оценки точности учитывают это изменение точки зрения.

Для валидации в одной лаборатории важны два набора условий: (a) точность в условиях повторяемости, описывающая вариативность, наблюдаемую во время одного прогона, как ожидание 0 и стандартное отклонение σ_r, и (b) точность в условиях повторяемости, описывающая вариативность в прогоне с погрешностью σ_{run} как ожидание 0, стандартное отклонение σ_{run} . Обычно оба этих источника ошибки действуют на отдельные аналитические результаты, которые, следовательно, имеют комбинированную точность

$$\sigma_{tot} = \left(\sigma_r^2 / n + \sigma_{run}^2\right)^{1/2}$$

где n - число повторных результатов, усредненных в рамках одного прогона для отчетного результата. Две оценки точности могут быть получены наиболее простым путем анализа выбранного тестового материала в двух экземплярах в нескольких последовательных сериях. Затем отдельные компоненты дисперсии могут быть рассчитаны с помощью одностороннего дисперсионного анализа. Каждый дублирующий анализ должен быть независимым выполнением процедуры, применяемой к отдельной части теста. В качестве альтернативы комбинированная точность σ_{tot} может быть оценена непосредственно путем анализа тестового материала один раз в
последовательных прогонов и оценки стандартного отклонения по обычному уравнению. (Обращают внимание, что наблюдаемые стандартные отклонения обычно обозначаются символом s, чтобы отличить их от стандартных отклонений σ).

Важно, чтобы значения прецизионности были репрезентативными для вероятных условий испытания. Во-первых, вариативность условий между пробами должна представлять то, что обычно происходит в лаборатории при рутинном использовании метода. Например, вариативность в партиях реагентов, аналитиках и приборах должна быть репрезентативной. Во-вторых, используемый тестовый материал должен быть типичным, с точки зрения матрицы и (в идеале) состояния измельчения, для материалов, которые могут встретиться при рутинном применении. Таким образом, фактические тестовые материалы или, в меньшей степени, эталонные материалы, соответствующие матрице,

подходят, а стандартные растворы аналита - нет. Следует также отметить, что ССО и подготовленные стандартные образцы часто гомогенизированы в большей степени, чем типичные контрольные материалы, и точность, полученная при их анализе, может

соответственно занижать вариативность, которая будет наблюдаться для контрольных материалов.

Точность очень часто изменяется в зависимости от концентрации аналита. Обычно предполагается, что i) точность не меняется в зависимости от концентрации аналита, или ii) стандартное отклонение пропорционально или линейно зависит от концентрации аналита. В обоих случаях предположение необходимо проверить, если ожидается, что уровень аналита будет существенно изменяться (то есть, более чем на 30% от центрального значения). Наиболее экономичным экспериментом, вероятно, будет простая оценка точности на крайних значениях рабочего диапазона или вблизи них, вместе с подходящим статистическим тестом на разницу в дисперсии. F-тест подходит для нормально распределенной ошибки.

Данные о точности могут быть получены для широкого спектра различных наборов условий в дополнение к указанным здесь минимальным условиям повторяемости и межпрогонных условий, и может быть целесообразно получить дополнительную информацию. Например, для оценки результатов или для улучшения измерений может быть полезно иметь указание на отдельные эффекты оператора и прогона, эффекты между или в течение дня или прецизионность, достижимую с помощью одного или нескольких приборов. Существует целый ряд различных схем и методов статистического анализа, и во всех подобных исследованиях настоятельно рекомендуется тщательная разработка эксперимента.

A6 Восстановление

Методы оценки восстановления обсуждаются вместе с методами оценки достоверности (выше).

A7 Диапазон

Валидированный диапазон - это интервал концентрации аналита, в пределах которого метод может считаться валидированным. Важно понимать, что этот диапазон не обязательно совпадает с полезным диапазоном калибровки. В то время как калибровка может охватывать широкий диапазон концентраций, остальная часть валидации (и обычно

гораздо более важная часть с точки зрения неопределенности) будет охватывать более ограниченный диапазон. На практике большинство методов валидируются только на одном или двух уровнях концентрации. Валидированный диапазон может быть взят как разумная экстраполяция от этих точек на шкале концентраций.

Когда использование метода сосредоточено на интересующей концентрации, значительно превышающей предел обнаружения, целесообразно проводить валидацию вблизи этого критического уровня. Невозможно определить общую безопасную экстраполяцию этого результата на другие концентрации аналита, поскольку многое зависит от индивидуальной аналитической системы. Поэтому в отчете о валидационном исследовании должен быть указан диапазон вокруг критического значения, в котором лицо, проводящее валидацию, используя профессиональное суждение, считает, что оценочная неопределенность соответствует действительности.

Когда интересующий диапазон концентраций приближается к нулю, или пределу обнаружения, неверно предполагать постоянную абсолютную неопределенность или постоянную относительную неопределенность. Полезным приблизительным соответствием в этом общем случае является предположение о линейной функциональной зависимости с положительной точкой пересечения ом между неопределенностью u и концентрацией c, которая имеет вид $u(c) = u_0 + \theta c$ где θ - относительная неопределенность, оцененная для некоторой концентрации, значительно превышающей предел обнаружения. u_0 - стандартная неопределенность, оцененная для нулевой концентрации и в некоторых обстоятельствах может быть оценена как $c_L/3$. В этих обстоятельствах было бы разумно рассматривать валидируемый диапазон как простирающийся от нуля до небольшого целого числа, кратного верхней точке валидации. Опять же, это зависит от профессионального суждения.

A8 Предел обнаружения

В широком смысле предел обнаружения — это наименьшее количество или концентрация аналита в исследуемом образце, которое можно надежно отличить от нуля.[22,23] Для аналитических систем, в которых валидационный диапазон не включает или приближается к нему, предел обнаружения не обязательно должен быть частью валидации.

Несмотря на кажущуюся простоту идеи, вся тема предела обнаружения сопряжена с проблемами, описанными ниже:

- Существует несколько возможных концептуальных подходов к этому вопросу, каждый из которых дает несколько иное определение предела. Попытки прояснить этот вопрос кажутся все более запутанными.
- Хотя каждый из этих подходов зависит от оценки точности при или около нулевой концентрации, неясно, следует ли считать, что это подразумевает условия повторяемости или какие-то другие условия для оценки.

- Если не собрать огромное количество данных, оценки предела обнаружения будут подвержены довольно большим случайным колебаниям.
- Оценки предела обнаружения часто смещены в низкую сторону из-за эксплуатационных факторов.
- Статистические выводы, касающиеся предела обнаружения, зависят от предположения о нормальности, которое по меньшей мере сомнительно при низких концентрациях.

Для большинства практических целей при валидации метода, по-видимому, лучше предпочесть простое определение, ведущее к быстро реализуемой оценке, которая используется только в качестве приблизительного ориентира полезности метода. Однако следует признать, что предел обнаружения, оцененный при разработке метода, может быть не идентичен по концепции или численному значению тому, который используется для характеристики полного аналитического метода. Например, «инструментальный предел обнаружения», указанный в литературе или брошюрах по приборам и затем скорректированный с учетом разбавления, часто намного меньше

«практического» предела обнаружения и не подходит для валидации метода.

Соответственно, рекомендуется, чтобы при валидации метода используемая оценка точности $(\hat{\sigma}_0)$ была основана, по крайней мере, на 6 независимых полных определениях концентрации аналита в типичной матричной заготовке или низкоуровневом материале, без цензурирования нулевых или отрицательных результатов, а приблизительный предел обнаружения

рассчитанный как $3^{3\hat{\sigma}_0}$ Обращают внимание, что при рекомендуемом минимальном количестве степеней свободы, это значение весьма неопределенно и может легко ошибиться в два раза. Если требуются более точные оценки (например, для поддержки решений, основанных на обнаружении или отсутствии материала), следует обратиться к соответствующему руководству (см., например, ссылки 22-23).

A9 Предел определения или предел количественного определения

Иногда полезно указать концентрацию, ниже которой аналитический метод не может работать с приемлемой точностью. Иногда эта точность произвольно определяется как 10% RSD, иногда предел столь же произвольно принимается как фиксированное кратное (обычно 2) от предела обнаружения. Хотя работа выше такого предела в определенной степени успокаивает, мы должны признать, что это довольно искусственная дихотомия шкалы концентраций: измерения ниже такого предела не лишены информационного содержания и вполне могут быть пригодны для использования. Следовательно, использование этого типа предела при валидации здесь не рекомендуется. Предпочтительнее попытаться выразить неопределенность измерения как функцию концентрации и сравнить эту функцию с критерием пригодности, согласованным между лабораторией и клиентом или конечным пользователем данных.

A10 Чувствительность

Чувствительность метода - это градиент калибровочной функции. Поскольку этот параметр обычно произволен и зависит от настроек прибора, он не может быть полезен при валидации. (Однако он может

быть полезен в процедурах обеспечения качества, чтобы проверить, соответствует ли прибор постоянным и удовлетворительным стандартам).

A11 Надежность

Надежность аналитического метода - это устойчивость к изменению результатов, полученных аналитическим методом, при незначительных отклонениях от экспериментальных условий, описанных в процедуре. Пределы для экспериментальных параметров должны быть прописаны в протоколе метода (хотя в прошлом это не всегда делалось), и такие допустимые отклонения, по отдельности или в любой комбинации, не должны приводить к значимым изменениям в полученных результатах. (Под «значимым изменением» в данном случае подразумевается, что метод не может работать в согласованных пределах неопределенности, определяющих его пригодность к применению). Следует определить аспекты метода, которые могут повлиять на результаты, и оценить их влияние на эффективность метода с помощью испытаний на надежность.

Надежность метода проверяется путем преднамеренного внесения небольших изменений в процедуру и изучения влияния на результаты. Может потребоваться рассмотреть ряд аспектов метода, но поскольку большинство из них будут иметь незначительное влияние, обычно можно варьировать сразу несколько. Экономичный эксперимент, основанный на дробных факториальных схемах, был описан Юденом[13]. Например, можно сформулировать подход, использующий 8 комбинаций из 7 переменных факторов, то есть рассмотреть влияние семи параметров с помощью всего восьми аналитических результатов. Также возможны одномерные подходы, при которых изменяется только одна переменная за раз. Примерами факторов, на которые может быть направлен тест на надежность, являются: изменение прибора, оператора или марки реагента; концентрация реагента; pH раствора; температура реакции; время, необходимое для завершения процесса и т.д.

A12 Соответствие поставленной задаче

Соответствиу поставленной задаче - это степень, в которой производительность метода соответствует критериям, согласованным между аналитиком и конечным пользователем данных, которые описывают потребности конечного пользователя. Например, ошибки в данных не должны быть настолько велики, чтобы приводить к

неправильным решениям чаще, чем определенная небольшая вероятность, но они не должны быть настолько малы, чтобы конечный пользователь был вовлечен в ненужные расходы. Критерии пригодности целям могут быть основаны на некоторых

характеристиках, описанных в данном приложении, но в итоге будут выражены в терминах приемлемой общей неопределенности.

A13 Вариативность матрицы

Вариативность матрицы во многих отраслях является одним из наиболее важных, но наименее признанных источников ошибок в аналитических измерениях. Когда мы определяем аналитическую систему, подлежащую проверке, указывая, помимо прочего, матрицу испытуемого материала, может существовать возможность значительной вариативности в пределах определенного класса. В качестве крайнего примера можно привести образец класса «почва», который может состоять из глины, песка, мела, латерита (в основном Fe_2O_3 и Al_2O_3), торфа и т.д. или их смесей. Легко представить, что каждый из этих типов будет оказывать уникальный матричный эффект на такой аналитический метод, как атомно-абсорбционная спектрометрия. Если у нас нет информации о типе почв, которые мы анализируем, в результатах будет дополнительная неопределенность из-за этого переменного матричного эффекта.

Неопределенности, связанные с вариативностью матриц, должны быть оценены отдельно, поскольку они не учитываются в других процессах валидации. Информация получается путем сбора репрезентативного набора матриц, которые могут встречаться в рамках определенного класса, с концентрацией аналитов в соответствующем диапазоне. Материалы анализируются в соответствии с протоколом, и оценивается погрешность результатов. Если испытуемые материалы не являются ССО, оценку погрешности обычно проводят с помощью пиков и оценки восстановления. Неопределенность оценивается по стандартному отклонению погрешности. (Примечание: Эта оценка также будет содержать вклад дисперсии от повторного анализа. Если использовались пики, она будет иметь величину

$$2\sigma_r^2$$

Если требуется строгий бюджет неопределенности, этот член должен быть вычтен из дисперсии вариативности матрицы, чтобы избежать двойного учета.

A14 Неопределенность измерений

Формальный подход к оценке неопределенности измерений рассчитывает оценку неопределенности измерений на основе уравнения или математической модели. Процедуры, описанные как валидация метода, предназначены для обеспечения того, что уравнение, используемое для оценки результата, с учетом случайных ошибок всех видов, является достоверным выражением, воплощающим все признанные и значимые эффекты на результат. Из этого следует, что, с одной оговоркой, подробно описанной ниже, уравнение или «модель», подвергнутая валидации, может быть использована непосредственно для оценки неопределенности измерений. Это делается в соответствии с установленными принципами, основанными на «законе распространения неопределенности», который для независимых входных воздействий имеет вид

$$u(y(x_1,x_2,\ldots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 u(x_i)^2}$$

где $y(x_1,x_2,\ldots.x_n)$ функция нескольких независимых переменных $x_1,x_2\ldots$, и c_i коэффициент чувствительности, оцениваемый как $c_i=\partial y/\partial x_i$, частный дифференциал y относительно x_i. $u(x_i)$ и $u(y)$ *стандартные неопределенности*, то есть, измерение неопределенности, выраженное в виде стандартных отклонений. Поскольку $u(y(x_1,x_2,\ldots))$ является функцией нескольких отдельных оценок неопределенности, ее называют *комбинированной стандартной неопределенностью*.

Поэтому для оценки неопределенности измерения из уравнения $y=f(x_1,x_2\ldots)$, используемого для расчета результата, необходимо, во-первых, установить неопределенности $u(x_i)$ в каждом из членов x_1, x_2 и т.д., во-вторых, объединить их с дополнительными членами, необходимыми для представления случайных эффектов, обнаруженных при валидации, и, наконец, учесть любые дополнительные эффекты. При

обсуждении точности выше, подразумеваемая статистическая модель имеет вид

$$y=f(x_1,x_2...) + \sigma_{run} + e$$

где e случайная ошибка для конкретного результата. Поскольку из прецизионных экспериментов известно, что σ_{run} и e имеют стандартные отклонения σ_{run} и σ_r соответственно, эти последние члены (или, строго говоря, их оценки s_{run} и s_r) являются неопределенностями, связанными с этими дополнительными членами. При усреднении отдельных результатов в пределах пробега суммарная неопределенность, связанная с этими двумя условиями, составляет (как указано ранее)

$$s_{tot} = \left(s_r^2 / n + s_{run}^2\right)^{1/2}$$

Обращают внимание, что в тех случаях, когда показано, что условия точности зависят от уровня аналита, в оценке неопределенности для данного результата должен использоваться термин точности, соответствующий этому уровню. Основа для оценки неопределенности, соответственно, следует непосредственно из статистической модели, принятой и проверенной при валидации. К этой оценке следует добавить любые дополнительные условия, необходимые для учета (в частности) неоднородности и матричного эффекта (см. раздел A13). Наконец, рассчитанная стандартная неопределенность умножается на «коэффициент охвата», k, чтобы получить расширенную неопределенность, то есть «интервал, который, как ожидается, будет охватывать большую часть распределения значений, которые могут быть отнесены к измеряемому веществу»[8]. Если статистическая модель хорошо установлена, распределение известно как нормальное, а число степеней свободы, связанных с оценкой, велико, k обычно выбирается равным 2. Расширенная неопределенность в этом случае приблизительно соответствует 95% доверительного интервала.

Здесь необходимо добавить одно важное предостережение. При проверке предполагаемой статистической модели неизбежно используются несовершенные тесты. Уже отмечалось, что эти тесты не могут доказать, что какой-либо эффект идентично равен нулю; они могут только показать, что эффект слишком мал для обнаружения в пределах неопределенности, связанной с конкретным тестом на значимость. Особенно важным примером является тест на значительную лабораторную погрешность. Очевидно, что если это единственный тест, проведенный для подтверждения достоверности, то должна существовать некоторая остаточная неопределенность в отношении того, является ли метод действительно лишенным погрешности или нет. Из этого следует, что если такая неопределенность значительна по отношению к неопределенности, рассчитанной к настоящему моменту, необходимо сделать дополнительную поправку.

В случае неопределенного опорного значения, наиболее простым допуском является заявленная неопределенность для материала в

сочетании со статистической неопределенностью применяемого испытания. Полное обсуждение выходит за рамки данного текста; более подробная информация представлена в ссылке 9. Однако важно

отметить, что хотя неопределенность, оцененная непосредственно по предполагаемой статистической модели, является *минимальной* неопределенностью, которая может быть связана с аналитическим результатом, она почти наверняка будет заниженной; аналогично, расширенная неопределенность, основанная на тех же соображениях и использующая k=2, не обеспечит достаточной уверенности.

Руководство ISO[8] рекомендует, что для повышения уверенности, вместо произвольного добавления терминов, значение k следует увеличивать по мере необходимости. Практический опыт подсказывает, что для оценок неопределенности, основанных на валидированной статистической модели, но при отсутствии доказательств за пределами валидационных исследований для обеспечения дополнительной уверенности в модели, k не должно быть меньше 3. Если есть серьезные основания сомневаться в том, что валидационное исследование является всеобъемлющим, k следует дополнительно увеличить по мере необходимости.

ПРИЛОЖЕНИЕ B. Дополнительные соображения по поводу ОЦЕНКИ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ВАЛИДАЦИИ

B1 Анализ чувствительности

Основное выражение, используемое при оценке неопределенности

$$u(y(x_1,x_2,\ldots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 u(x_i)^2}$$

требует наличия «коэффициентов чувствительности» c_i. При оценке неопределенности часто бывает так, что хотя данный фактор влияния x_i имеет известную неопределенность $u(x_i)$, коэффициент c_i недостаточно охарактеризован или не может быть легко получен из уравнения для результата. Это особенно часто случается, когда эффект не включен в уравнение измерения, потому что он обычно не является значимым, или потому что взаимосвязь недостаточно изучена, чтобы обосновать поправку. Например, влияние температуры раствора T_{sol} на процедуру экстракции при комнатной температуре редко устанавливается в деталях.

Если необходимо оценить неопределенность результата, связанную с таким эффектом, можно определить коэффициент экспериментально. Это делается наиболее простым способом - изменением x_i и наблюдением за влиянием на результат, что очень похоже на основные испытания на прочность. В большинстве случаев достаточно выбрать не более двух значений x_i, отличных от номинального, и рассчитать приблизительный градиент по наблюдаемым результатам. Градиент дает приблизительное значение для c_i. Затем можно определить член $c_i.u(x_i)$. (Обращают внимание, что это один из практических методов демонстрации значимости или отсутствия возможного влияния на результаты).

В таком эксперименте важно, чтобы наблюдаемое изменение результата было достаточным для надежного расчета c_i. Это трудно предсказать заранее. Однако, учитывая допустимый диапазон для влияющей величины x_i, или расширенную неопределенность для этой величины, которая, как ожидается, приведет к незначительному изменению, очевидно, важно оценить c_i из большего диапазона. Соответственно, рекомендуется, чтобы для величины влияния с ожидаемым диапазоном $\pm a$, (где $\pm a$ может быть, например, допустимым диапазоном, расширенным интервалом неопределенности или 95% доверительного интервала) эксперимент по чувствительности использовал, где это возможно, изменение не менее $4a$ для обеспечения надежных результатов.

B2 Заключение

Нередко бывает так, что, хотя эффект признан и может быть значительным, не всегда возможно получить надежную оценку неопределенности. В таких обстоятельствах в Руководстве ISO четко указано, что профессионально продуманная оценка неопределенности предпочтительнее, чем пренебрежение неопределенностью. Таким образом, при отсутствии оценки неопределенности для потенциально важного эффекта, аналитик должен сделать свое собственное лучшее суждение о вероятной неопределенности и применить его при оценке комбинированной неопределенности. Ссылка 8 дает дальнейшее руководство по использованию суждения при оценке неопределенности.

Рекомендации по неопределенности измерений

(Резолюция oeno 9/2005)

ВВЕДЕНИЕ

Важно, чтобы аналитики знали о неопределенности, связанной с каждым аналитическим результатом, и об оценках неопределенности. Неопределенность измерения может быть получена с помощью ряда процедур. Лаборатории по анализу пищевых продуктов обязаны осуществлять контроль, использовать совместно проверенные методы, когда это возможно, и проверять их применение, прежде чем использовать их в повседневной работе. Поэтому такие лаборатории имеют в своем распоряжении ряд аналитических данных, которые могут быть использованы для оценки неопределенности измерений.

Терминология

Принятое определение неопределенности измерения[1] следующее:
«Параметр, связанный с результатом измерения, который характеризует дисперсию значений, которые могут быть обоснованно отнесены к измеряемому веществу.

ПРИМЕЧАНИЯ:

1. Параметром может быть, например, стандартное отклонение (или заданное кратное ему), или полуширина интервала с заданным уровнем достоверности.

2. Неопределенность измерения включает в себя, в общем случае, много компонентов. Некоторые из этих компонентов могут быть оценены на основе статистического распределения результатов серии измерений и могут быть охарактеризованы экспериментальными стандартными отклонениями. Другие компоненты, которые также могут быть охарактеризованы стандартными отклонениями, оцениваются по предполагаемым распределениям вероятности, основанным на опыте или другой информации.

3. Подразумевается, что результат измерения является наилучшей оценкой значения измеряемой величины, и что все компоненты неопределенности, включая компоненты, возникающие в результате

систематических эффектов. Такие как компоненты, связанные с поправками и эталонами, вносят вклад в дисперсию.»

[*Признано, что термин «неопределенность измерения» наиболее широко используется международными организациями и агентствами по аккредитации. Однако Комитет Codex ALIMENTARIUS по методам анализа и отбора проб в ряде случаев отмечал, что термин «неопределенность измерений» имеет некоторые негативные ассоциации в юридическом контексте, и поэтому отметил, что может использоваться альтернативный, эквивалентный термин «надежность измерений».]*

Рекомендации

Правительствам предлагаются следующие рекомендации:

1. Для целей Международной организации виноградарства и виноделия должен использоваться термин «неопределенность измерения» или «надежность измерения».

2. Неопределенность измерения или «надежность измерения», связанная со всеми аналитическими результатами, должна быть оценена и по запросу должна быть предоставлена пользователю (заказчику) результатов.

3. Неопределенность измерения или «надежность измерения» результата анализа может быть оценена с помощью ряда процедур, в частности, описанных ISO[1] и EURACHEM (Европейское общество по аналитической химии[2)]. Эти документы рекомендуют процедуры, основанные на компонентном подходе, данных валидации метода, данных внутреннего контроля качества и данных квалификационных испытаний. Необходимость в проведении оценки неопределенности измерений или «надежности измерений» с использованием компонентного подхода ISO не требуется, если другие формы данных доступны и используются для оценки неопределенности или надежности. Во многих случаях общая неопределенность может быть определена в результате межлабораторного (совместного) исследования ряда лабораторий и ряда матриц по методике IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL[3] или по протоколам ISO 5725[4].

БИБЛИОГРАФИЯ

1. "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", ISO, Geneva, 1993.

2. EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty In Analytical Measurement (Second Edition), EURACHEM Secretariat, HAM, Berlin, 2000. This is available as a free download from http://www.vtt.fi/ket/eurachem.

3. "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies", ed. W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 1995, 67, 331-343.

4. "Precision of Test Methods", Geneva, 1994, ISO 5725, Previous editions were published in 1981 and 1986.

Рекомендации по коррекции восстановления

(Резолюция OIV-Oeno 392/2009)

Восстановление

«Международная организация виноградарства и виноделия (МОВВ) рекомендует следующую практику в отношении отчетности по восстановлению результатов анализа.

- Результаты анализа должны быть выражены на основе поправки на восстановление, где это уместно и целесообразно, а в случае поправки это должно быть указано.
- Если результат был скорректирован на восстановление, следует указать метод, с помощью которого учитывалось восстановление. Коэффициент восстановления должен быть указан везде, где это возможно.
- При изложении положений для стандартов необходимо указать, должен ли результат, полученный методом, используемым для анализа в рамках проверки соответствия, быть выражен на основе поправки на восстановление или нет.»

Приложение F

Специальные методы для анализа виноградного сахара[1] (ректифицированное концентрированное сусло)

[1] Виноградный сахар определен в части I-6.2 и в части II-2.1.12 Международного кодекса энологической практики Международной организации виноградарства и виноделия.
Спецификации виноградного сахара описаны в файле COEI-1-SUCRAI Международного энологического кодекса Международной организации виноградарства и виноделия.

Метод OIV-MA-F1-01 Метод IV типа

Электропроводность

(Резолюция Oeno 419A-2011)

1. Сущность метода

Электропроводность столба жидкости, определяемая двумя параллельными платиновыми электродами на его концах, измеряется путем включения его в одно плечо моста Уитсона.
Электропроводность изменяется в зависимости от температуры, поэтому она выражается при 20°C.

2. Реактивы

Используют только химически чистые вещества

2.1 Очищенная вода для лабораторий, с удельной проводимостью ниже 2 мк $См^{-1}$ при 20°C, например, вода EN ISO 3696 тип II.

2.2 Эталонный раствор хлорида калия.
Растворяют 0,581 г хлорида калия, KCl, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 105°C, в деминерализованной воде (2.1). Доводят объем до одного литра деминерализованной водой (2.1). Данный раствор имеет проводимость 1 000 $мкСм^{-1}$ при 20°C. Его не следует хранить более трех месяцев.
Можно использовать коммерческий препарат.

3. Аппаратура

3.1 Кондуктометр, позволяющий проводить измерения электропроводности в диапазоне от 1 до 1 000 микросименсов на см ($мкСм^{-1}$).
3.2 Водяная баня для доведения температуры анализируемых образцов примерно до 20°C (20 ± 2°C).

4. Проведение исследования

4.1 Подготовка анализируемого образца

Используют раствор с общей концентрацией сахаров 25 ± 0.5 % (м/м) (25° Вх): взвешивают массу, равную 2500/P, и доводят до 100 г водой (2.1),

P = процент (м/м) общих сахаров в ректифицированном концентрированном сусле.

4.2 Определение электропроводности

Доводят температуру анализируемого образца до 20°C, погрузив его в водяную баню. Поддерживают температуру в пределах ±0,1°C.

Дважды промывают ячейку электропроводности исследуемым раствором.

Измеряют электропроводность и выражают результат в мкСм$^{-1}$.

5. Выражение результатов

Результат выражают в микросименсах на см (мкСм$^{-1}$) при 20°C с точностью до целого числа для 25% (м/м) (25° Вх) раствора ректифицированного концентрированного сусла.

5.1 Расчеты

Если прибор не имеет температурной компенсации, корректируют измеренную проводимость, используя таблицу I. Если температура ниже 20°C, добавляют поправку; если температура выше 20°C, вычитают поправку.

6. Характеристики точности метода (прецизионность)

Повторяемость (r)

r = *3 мкСм*

Воспроизводимость (R)

R = *16 мкСм*

ТАБЛИЦА I

Поправки, которые необходимо внести в электропроводность для температур, отличных от 20°C (мкСм$^{-1}$)

Электропроводность	Температура (°C)									
	20.2 19.8	20.4 19.6	20.6 19.4	20.8 19.2	21.0 19.0	21.2 18.8	21.4 18.6	21.6 18.4	21.8 18.2	22,0[1] 18.0[2]
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2
100	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4
150	1	1	2	3	3	4	5	5	6	7
200	1	2	3	3	4	5	6	7	8	9
250	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11
300	1	3	4	5	7	8	9	11	12	13
350	1	3	5	6	8	9	11	12	14	15
400	2	3	5	7	9	11	12	14	16	18
450	2	3	6	8	10	12	14	16	18	20
500	2	4	7	9	11	13	15	18	20	22
550	2	5	7	10	12	14	17	19	22	24
600	3	5	8	11	13	16	18	21	24	26

[1]Вычесть поправку.
[2]Добавить поправку.

Метод OIV-MA-F1-02 Метод IV типа

Гидроксиметилфурфурол (ГМФ) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

(Резолюция Oeno 419A-2011)

1. Сущность метода

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)
Разделение через колонку методом обращенно-фазовой хроматографии и определение при 280 нм.

2. Реактивы

2.1 Очищенная вода для лабораторного использования и стандарта качества EN ISO 3696
2.2 Метанол, CH_3OH, дистиллированный или ВЭЖХ качества. - CAS 67-59-1
2.3 Уксусная кислота, CH_3COOH, (ρ_{20} = 1,05 г/мл). – CAS 64-19-7
2.4 Подвижная фаза: вода (2.1)-метанол (2.2)-уксусная кислота (2.3), предварительно отфильтрованная через мембранный фильтр (0.45 мкм), (40:9:1 об/об).
Эта подвижная фаза должна готовиться ежедневно и дегазироваться перед использованием.
2.5 Эталонный раствор гидроксиметилфурфурола, 25 мг/л (м/об).
В объемную колбу на 100 мл помещают 25 мг гидроксиметилфурфурола, $C_6H_3O_6$, точно взвешенного, и доводят до метки метанолом (2.2).
Разбавляют данный раствор 1/10 метанолом (2.2) и отфильтровывают через мембранный фильтр (0.45 мкм).
При хранении данного раствора в герметично закрытой бутылке из коричневого стекла в холодильнике он сохранится в течение двух-трех месяцев.
(Концентрация эталонного раствора приведена для справки)

3. Оборудование

3.1 Аппаратура
3.1.1 Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный:
- петлевым инжектором, 5 или 10 мкл (в качестве примера),
- спектрофотометрическим детектором для проведения измерений при 280 нм,
- колонной из октадецилсвязанного диоксида 10213-10-2 ия *(например: Bondapak C18 — Corasil,Waters Ass.),*
- регистратором и, при необходимости, интегратором,

Скорость потока подвижной фазы: 1,5 мл/мин (в качестве примера).

3.1.2 Мембранный фильтрационный аппарат, диаметр пор 0.45 мкм.

4. Проведение исследования

4.1 Подготовка анализируемого образца

Используют раствор, полученный путем разбавления ректифицированного концентрированного сусла до 40% (м/об) (вносят 200 г точно взвешенного ректифицированного концентрированного сусла в объемную колбу на 500 мл. Доливают воду до метки и гомогенизируют) и фильтруют его через мембранный фильтр (0.45 мкм).

4.2 Хроматографическое определение

Вносят в хроматограф 5 (или 10) мкл образца, приготовленного, как описано в пункте 4.1. и 5 (или 10) мкл эталонного раствора гидроксиметилфурфурола (2.5). Записывают хроматограмму.

Время хранения гидроксиметилфурфурола составляет приблизительно шесть-семь минут.

Объем вводимого вещества и последовательность указаны для ориентира. Хроматографическое определение также может быть выполнено с помощью калибровочной кривой.

5. Выражение результатов

Концентрацию гидроксиметилфурфурола в ректификованном концентрированном сусле выражают в миллиграммах на килограмм общего количества сахаров.

5.1 Расчеты

Пусть концентрация гидроксиметилфурфурола в 40% (м/об) растворе ректификата концентрированного должна быть С мг/л.

Концентрацию гидроксиметилфурфурола в миллиграммах на килограмм общего количества сахаров определяют следующим образом:

$$250 \times C/P$$

P = процент (м/м) концентрации общих сахаров в ректифицированном концентрированном сусле.

6. Характеристики точности метода (прецизионность)

Повторяемость (r)

r = *0.5 мг/кг общего количества сахаров*

Воспроизводимость (R)

R = *3.0 мг/кг общего количества сахаров*

Метод OIV-MA-F1-03 Метод IV типа

Определение приобретенной крепости алкоголя по объему концентрированного сусла и виноградного сахара (или ректифицированного концентрированного сусла)

(Резолюция Oeno 419A-2011)

1. Введение

Концентрированное сусло (КС) и виноградный сахар (РКС) являются вязкими продуктами с низким содержанием спирта; для определения их приобретенной крепости алкоголя (КА) необходимо использовать метод, характеристики которого (линейность, повторяемость, воспроизводимость, специфичность, пределы обнаружения и количественного определения) должны быть такими, чтобы можно было измерять содержание спирта менее 1%.

2. Область применения

Метод применяется к концентрированным суслам и виноградному сахару.

3. Сущность метода

Известную массу концентрированного сусла (КС) или виноградного сахара подщелачивают суспензией гидроксида кальция и затем перегоняют. Спиртовую крепость по объему дистиллята определяют с помощью электронной денситометрии или денситометрии с использованием гидростатического баланса.

4. Реактивы

- Суспензия 2М гидроксида кальция аналитического качества, полученная путем осторожного выливания

одного литра горячей воды (от 60°C до 70°C) на около 120 г негашеной извести (CaO).

- Раствор пеногасителя, полученный путем разведения 2 мл концентрированной силиконовой антипены в 100 мл воды.
- Очищенная вода для лабораторного использования качества EN ISO 3696.

5. Оборудование

- Стандартное лабораторное оборудование, включая волюметрические колбы
- Аналитические весы, способные взвешивать с точностью до 0,1 г
- Можно использовать любой тип аппарата для дистилляции или паровой дистилляции при условии, что он удовлетворяет следующим требованиям:
  Перегоняют смесь этанола и воды с крепостью спирта 10% пять раз подряд. После пятой перегонки крепость дистиллята должна составлять не менее 9,9%, т.е. потеря спирта при каждой перегонке не должна превышать 0,02%.
- Электронный плотномер или гидростатические весы.

6. Проведение исследования

- Гомогенизируют исследуемый образец, перевернув колбу несколько раз.
- В волюметрической колбе на 500 мл взвешивают около 200 г концентрированного сусла или ректифицированного концентрированного сусла (с точностью до 0,1 г). Записывают вес данного образца. Доливают до метки деионизированную воду. Данный раствор составляет около 40% м/в в сусле.

Получение дистиллята

- Переносят 250 мл 40%-ного раствора в перегонную колбу, добавляют в колбу около 10 мл суспендированного гидроксида кальция, около 5 мл раствора антипены и, если применимо, регулятор кипения (например, кусочки фарфора).
- Осторожно доводят до кипения.
-

- Собирают дистиллят в волюметрическую колбу на 100 мл (около 90 мл).
- Остужают дистиллят до температуры окружающей среды, затем доливают деионизированную воду до отметки.

Измерение крепости алкоголя
Выполняют с помощью электронной денситометрии или гидростатического баланса.

7. Расчеты

Приобретенная алкогольная крепость по объему =

$$\frac{\text{ASV measured X 200 X MV}}{\text{TS}}$$

ASV measured = содержание спирта, определяемое плотномером, в % от объема
TS = контрольный образец концентрированного сусла или виноградного сахара, в весе.
MV = плотность концентрированного сусла или ректифицированного концентрированного сусла, в г/мл
Результаты выражают с точностью до 2 десятичных знаков и округляют с точностью до 0,05 %.

8. Характеристики точности метода (прецизионность)

8.1 Линейность реакции
Линейность плотномера для низких значений крепости алкоголя (КА) является одним из критических параметров данного метода. Был подготовлен стандартный диапазон из 10 водно-спиртовых растворов в диапазоне АК от 0 до 5%. Каждый раствор анализировался 3 раза.
Реакция плотномера идеально линейна в этом диапазоне, как показано линией калибровки на рисунке 1.

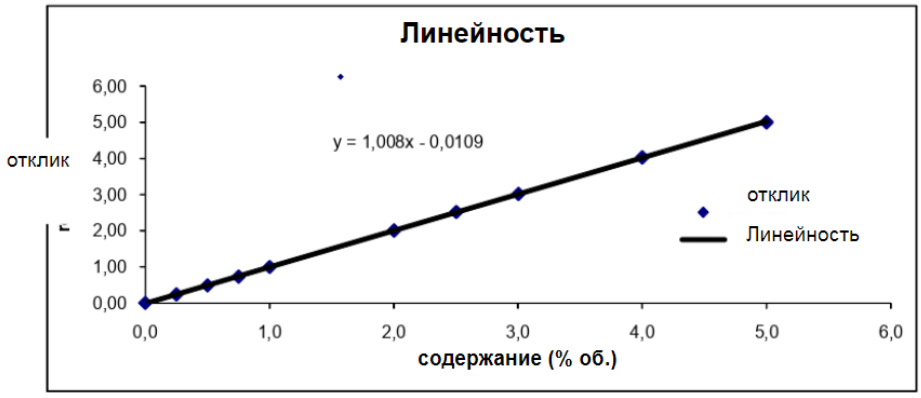


Рисунок 1: Линейность определения КА методом электронной денситометрии в диапазоне от 0 до 5%.

8.2 Специфичность метода

Второй критической точкой этого метода является дистилляция вязкого сусла, содержащего небольшое количество спирта. Для того чтобы проверить специфичность, к концентрированному суслу и виноградному сахару добавляли известные количества этанола (от 0,25% до 5%). Добавленные тестовые образцы перегонялись в условиях, определенных ранее, затем дистилляты анализировались с помощью электронной денситометрии или **гидростатического баланса**.

Результаты приведены в Таблице 1. Коэффициент восстановления удовлетворительный, колеблется между 88% и 99%. Как показывает линия на рисунке 2, метод специфичен (наклон вблизи 1, точка пересечения a вблизи 0).

Таблица 1: Скорость восстановления для определения приобретенной крепости алкоголя концентрированного сусла (КС) и виноградного сахара

Тестируемый образец	Исходное содержание (%)	Добавленное содержание (%)	Восстановленное содержание (%)	Скорость восстановления (%)
КС 1	0.00	0.25	0.22	88
КС1	0.00	1.00	0.98	98
Виноградный сахар 1	0.00	1.00	0.94	94
Виноградный сахар 1	0.00	2.00	1.97	99
КС 2	0.00	0.50	0.44	88
Виноградный сахар 2	0.00	5.00	4.94	99

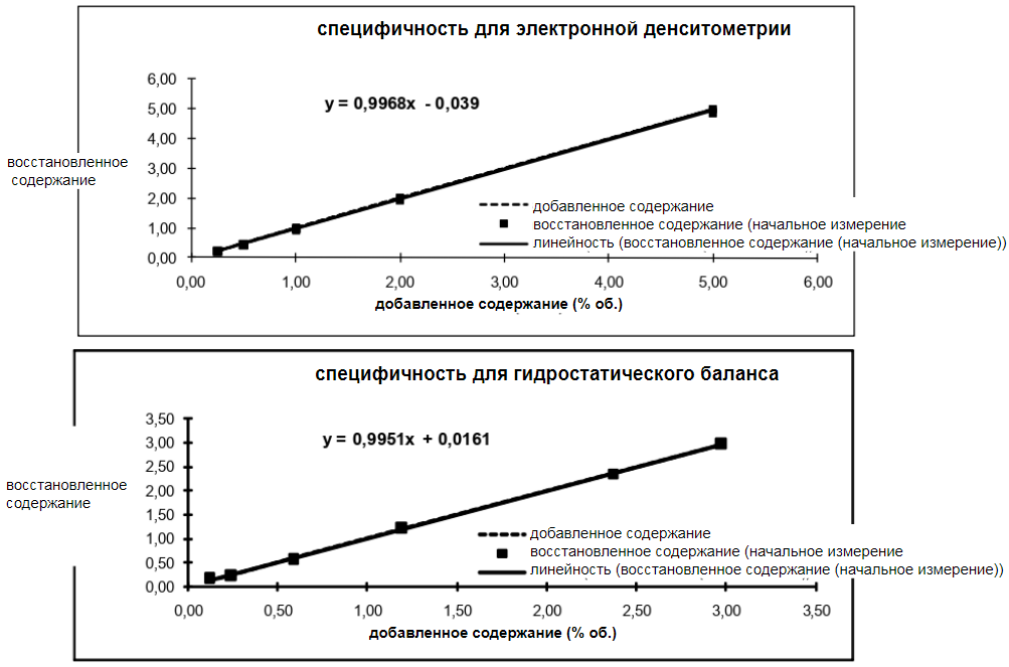


Рисунок 2: Специфичность определения приобретенной крепости алкоголя концентрированного сусла (КС) и виноградного сахара

8.3 Повторяемость

Повторяемость метода была определена с использованием 20 тестовых образцов концентрированного сусла или виноградного сахара, дополненных спиртом или нет. Каждый образец концентрированного сусла или виноградного сахара анализировался 3 раза, чтобы обеспечить идентичные условия. Полученные пределы воспроизводимости следующие:

Таблица 2: Повторяемость определения приобретенной крепости алкоголя концентрированного сусла (КС) и виноградного сахара

Повторяемость при электронной денситометрии	Рассчитанное значение
Стандартное отклонение	0.009
CV или RSD как %	0.9%
r предел	0.024 % об.
r предел как %	**3%**
Повторяемость для гидростатического баланса	**Рассчитанное значение**
Стандартное отклонение	0.013
CV или RSD как %	1.7%
r предел	0.038 % об.
r предел как %	**5,3%**

8.4 Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов определяют путем анализа одного и того же сусла дважды, в разные даты в течение определенного периода времени. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Воспроизводимость определения приобретенной крепости алкоголя концентрированного сусла (КС) и виноградного сахара

Воспроизводимость при электронной денситометрии	Рассчитанное значение
Стандартное отклонение	0.043
CV или RSD как %	3%
R предел	0.12% об.
R предел как %	**9%**

Воспроизводимость для гидростатического баланса	Рассчитанное значение
Стандартное отклонение	0.026
CV или RSD как %	3.4%
R предел	0.076% об.
R предел как %	**10.6%**

8.5 Пределы обнаружения и количественного определения

Пределы обнаружения (ПО) и количественного определения (КО), оцененные на основе исследования линейности, следующие:

ПО = 0.01% КО = 0.05%

Предел количественного определения был проверен путем анализа сусла, имеющего крепость алкоголя на уровне концентрации 0,05%.

8.6 Неопределенность

Неопределенность, оцененная на основе стандартного отклонения воспроизводимости, составляет0.10%.

Метод OIV-MA-F1-03 Метод IV типа

Определение сахарозы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

(Резолюция Oeno 419A-2011)

1. Сущность метода

Для тестирования и определения сахарозы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии: сахароза разделяется в колонне с алкиламино-связанным диоксидом и определяется с помощью рефрактометрии. Результат количественно оценивается по отношению к внешнему стандарту, проанализированному в тех же условиях.

Примечание: Подлинность сусла или вина может быть проверена методом ЯМР ядер дейтерия, описанным для выявления обогащения сусла, ректифицированного концентрированного сусла и вина.

Хроматографические условия приведены для ориентира.

2. Реактивы

2.1 Очищенная вода для лабораторного использования качества EN ISO 3696.

2.2 Ацетонитрил качества ВЭЖХ (CH_3 CN) – CAS 75-05-8

2.3 Сахароза – CAS 57-50-1

2.4 Подвижная фаза: ацетонитрил-вода (80:20 об/об), предварительно подвергнутая мембранной фильтрации (0,45 мкм); состав подвижной фазы приведен в качестве примера.

Перед использованием эту подвижную фазу необходимо дегазировать.

2.5 Стандартный раствор: 1,2 г/л водного раствора сахарозы. Отфильтровывают с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм. (Концентрация стандартного раствора приведена в качестве примера).

3. Оборудование

3.1 Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный:

- 10 мкл петлевым инжектором (в качестве примера)
- детектором: дифференциальный рефрактометр или интерферометрический рефрактометр
- колонкой из алкиламинсвязанного диоксида, длина 25 см, внутренний диаметр 4 мм (в качестве примера)
- защитной колонкой, заполненной той же фазой (в качестве примера)

- устройством для изоляции защитной колонки и аналитических колонок или для поддержания их температуры (30° C),
- регистратором и, при необходимости, интегратором
- скоростью потока подвижной фазы: 1 мл/мин (в качестве примера).

3.2 Оборудование для мембранной фильтрации (0.45 мкм).

4. Проведение исследования

4.1 Подготовка анализируемого образца:

Используют раствор, полученный путем разбавления ректифицированного концентрированного сусла до 40% (м/об), как описано в Приложении H «Общая кислотность», раздел 5.1., и фильтрования с использованием мембранного фильтра 0,45 мкм.

4.2 Хроматографическое определение

Поочередно вносят в хроматограф 10 мкл стандартного раствора и 10 мкл образца, приготовленного, как описано в пункте 4.1.

Повторяют эти инъекции в том же порядке.

Записывают хроматограмму.

Время хранения сахарозы составляет приблизительно 10 минут.

Объем образца и последовательность указаны для ориентира. Хроматографическое определение также может быть выполнено с помощью калибровочной кривой.

5. Расчеты

Для расчета используют среднее значение двух результатов для стандартного раствора и образца.

Пусть C - концентрация сахарозы в г/л в 40% (м/об) растворе ректифицированного концентрированного сусла.

Тогда концентрация сахарозы в г/кг ректифицированного концентрированного сусла составляет:

$$2.5 \times C$$

6. Выражение результатов

Концентрацию сахарозы выражают в граммах на килограмм с точностью до одного знака после запятой.

7. Характеристики точности метода (прецизионность)

Повторяемость (r)

$$r = 1.1 \text{ г/кг сусла}$$

Метод OIV-MA-F1-05 Метод IV типа

ОБЩАЯ КИСЛОТНОСТЬ

(Резолюция Oeno 419A-2011)

1. Определение

Общая кислотность ректифицированного концентрированного сусла - это сумма его титруемых кислот при титровании до pH 7 по отношению к стандартному щелочному раствору.
Диоксид углерода не включается в общую кислотность.

2. Сущность метода

2.1 Потенциометрическое титрование или титрование с использованием бромтимолового синего в качестве индикатора и сравнение с цветовым стандартом конечной точки.

3. Реактивы

3.1 Буферные растворы
3.1.1 pH 7.0:

дигидроортофосфат калия, (KH_2PO_4) .....107.3 г
1 М раствор гидроксида натрия (NaOH)..... 500 мл
вода до.....1 000 мл

3.1.2 pH 4.0

Раствор гидрофталата калия, 0,05 М, содержащий 10,211 г гидрофталата калия ($C_8H_5KO_4$) на литр при 20° С.

Примечание: можно использовать коммерческие эталонные буферные растворы, прослеживаемые до SI.

Например: pH 1.679 ± 0.01 при 25°C
pH 4.005 ± 0.01 при 25°C
pH 7.000 ± 0.01 при 25°C

3.2 0,1 М раствор гидроксида натрия (NaOH).
3.3 4 г/л раствор индикатора бромтимолового синего:

Бромтимоловый синий ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$):……. 4 г
Нейтральный этанол 96% 200мл

Растворяют и добавляют:

Воду, не содержащая CO_2 .....200 мл

1 М раствор гидроксида натрия, достаточный для получения сине-зеленого цвета (pH 7) приблизительно ..... 7.5 мл
Воду до.....1000 мл

4. Аппаратура

4.1 Потенциометр со шкалой, градуированной в значениях pH, и электроды.
Напоминаем, что стеклянный электрод должен храниться в дистиллированной воде. Каломельный/насыщенный хлоридом калия электрод должен храниться в насыщенном растворе хлорида калия. Чаще всего используется комбинированный электрод: его следует хранить в дистиллированной воде.
4.2 Коническая колба 100 мл.

5. Проведение исследования

5.1 Подготовка анализируемого образца:
Вносят 200 г точно взвешенного ректифицированного концентрированного сусла. Доливают до метки 500 мл воды. Гомогенизируют.
5.2 Потенциометрическое титрование.
5.2.1 Обнуление аппаратуры
Обнуление выполняют перед проведением любого измерения в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к используемому прибору.
5.2.2 Калибровка pH-метра
pH-метр должен быть откалиброван при 20°C с использованием стандартных буферных растворов, прослеживаемых до SI. Выбранные значения pH должны охватывать диапазон значений, которые могут встречаться в суслах. Если используемый pH-метр не совместим с калибровкой при достаточно низких значениях, можно использовать поверку с использованием стандартного буферного раствора, связанного с SI и имеющего значение pH, близкое к значениям, встречающимся в суслах.
5.2.3 Методика измерения
В коническую колбу (4.4) вносят 50 мл образца, подготовленного, как описано в пункте 5.1.

Добавляют около 10 мл дистиллированной воды, а затем добавляют 0,1 М раствор гидроксида натрия (3,2) из бюретки, пока pH не станет равным 7 при 20°C.
Гидроксид натрия следует добавлять медленно, непрерывно перемешивая раствор.
Пусть n мл - объем добавленного 0.1 M NaOH.
5.3 Титрование с индикатором (бромтимоловый синий)
5.3.1 Предварительное испытание: определение цвета конечной точки.

В коническую колбу (4.4) помещают 25 мл кипяченой дистиллированной воды, 1 мл раствора бромтимолового синего (3.3) и 50 мл образца, подготовленного как в пункте (5.1).
Добавляют 0,1 М раствор гидроксида натрия (3.2) до изменения цвета на сине-зеленый.
Затем добавляют 5 мл буферного раствора pH 7 (3.1).
5.3.2 Измерения
В коническую колбу (4.4) помещают 30 мл кипяченой дистиллированной воды, 1 мл раствора бромтимолового синего (3.3) и 50 мл образца, подготовленного, как описано в пункте 5.1.
Добавляют 0,1 М раствор гидроксида натрия (3.2) до получения такого же цвета, как в предварительном тесте выше (5.3.1).
Пусть n мл – объем добавленного 0,1 М гидроксида натрия.

6. Выражение результатов

6.1 Расчеты
- Общую кислотность, выраженную в миллиэквивалентах на килограмм ректифицированного концентрированного сусла, определяют следующим образом: A = 5 x n
- Общую кислотность, выраженную в миллиэквивалентах на килограмм общего количества сахаров, определяют следующим образом: A = (500 x n)/P

P = % концентрация (м/м) общего количества сахаров.
Записывают с точностью до одного десятичного знака.

7. Характеристики точности метода (прецизионность)

Повторяемость (r)

r = *0.4 мЭкв/кг общего количества сахаров*

Воспроизводимость (R)

R = *2.4 мЭкв/кг общего количества сахаров*

Метод OIV-MA-F1-06 Метод IV типа

pH

(Резолюция Oeno 419A-2011)

1. Сущность метода

Измеряется разность потенциалов между двумя электродами, погруженными в исследуемую жидкость. Один из этих двух электродов имеет потенциал, который является функцией pH жидкости, в то время как другой имеет фиксированный и известный потенциал и представляет собой электрод сравнения.

2. Реактивы

2.1 Буферные растворы

2.1.1 Насыщенный раствор гидротартрата калия, содержащий не менее 5,7 г гидротартрата калия на литр ($C_4H_5KO_6$) при 20° C. (Этот раствор можно хранить до месяца, добавив 0,1 г тимола на 200 мл).

pH/температура

3.57 при 20 ºC
3.56 при 25 ºC
3.55 при 30 ºC

2.1.2 Раствор гидрофталата калия, 0,05 M, содержащий 10,211 г гидрофталата калия ($C_8H_5KO_4$) на литр при 20 °C. (Максимальный срок хранения - два месяца).

pH/температура

3.999 при 15 ºC
4.003 при 20 ºC
4.008 при 25 ºC
4.015 при 30 ºC

2.1.3 Раствор с содержанием:

дигидроортофосфата калия, KH_2PO_4 .....3.402 г
гидроортофосфата калия, K_2HPO_4 .....4.354 г
воды до.....1 000 мл

(максимальный срок хранения - два месяца)

pH/температура
6.90 при 15 ºC
6.88 при 20 ºC
6.86 при 25 ºC
6.85 при 30 ºC

Примечание: можно использовать коммерческие эталонные буферные растворы, прослеживаемые до SI.

Например: pH 1.679 ±0.01 при 25°C
pH 4.005 ± 0.01 при 25°C
pH 7.000 ± 0.01 при 25°C

3. Аппаратура

3.1 pH-метр со шкалой, откалиброванной в единицах pH и позволяющей проводить измерения с точностью не менее ±0.01.

3.2 Электроды:
3.2.1 Стеклянный электрод.
3.2.2 Каломельно-насыщенный хлоридно-калиевый электрод сравнения
3.2.3 Или комбинированный электрод.

4. Проведение исследования

4.1 Подготовка анализируемого образца
Разбавляют ректифицированное концентрированное сусло водой до концентрации 25 ± 0,5 % (м/м) общих сахаров (25° Bx).

Если P - процентная концентрация (м/м) общего количества сахаров в ректифицированном концентрированном сусле, взвешивают массу:

$$2500/P$$

и доводят до 100 г водой.
Используемая вода должна иметь проводимость ниже 2 микросименсов на см.
4.2 Обнуление аппаратуры
Обнуление выполняют перед проведением любого измерения в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к используемому прибору.
4.3 Калибровка pH-метра
pH-метр должен быть откалиброван при 20°C с использованием стандартных буферных растворов, прослеживаемых до SI. Выбранные

значения pH должны охватывать диапазон значений, которые могут встречаться в суслах. Если используемый pH-метр не совместим с калибровкой при достаточно низких значениях, можно использовать поверку с использованием стандартного буферного раствора, связанного с SI и имеющего значение pH, близкое к значениям, встречающимся в суслах.

4.4 Определение

Опускают электрод в анализируемый образец, температура которого должна быть от 20 до 25 °C и как можно ближе к 20 °C.

Снимают значение pH непосредственно со шкалы.

Проводят не менее двух определений на одном и том же образце.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух определений.

5. Выражение результатов

pH 25% (м/м) (25° Bx) раствора ректифицированного концентрированного сусла указывают с точностью до двух десятичных знаков.

6. Характеристики точности метода (прецизионность)

Повторяемость (r)

$r = 0.07$

Воспроизводимость (R)

$R = 0.07$

Метод OIV-MA-F1-07 Метод IV типа

Диоксид серы

(Резолюция Oeno 419B-2011)

1. Терминология

Свободный диоксид серы определяется как диоксид серы, присутствующий в сусле в следующих формах: : H_2SO_3, HSO_3^-

Равновесие между этими формами является функцией pH и температуры:

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

H_2SO_3 представляет собой молекулярный диоксид серы.

Общий диоксид серы определяется как совокупность всех различных форм диоксида серы, присутствующих в сусле либо в свободном состоянии, либо в сочетании с его компонентами.

2. Материалы

Общий диоксид серы извлекают из предварительно разбавленного ректификованного концентрированного сусла путем захвата при высокой температуре (приблизительно 100 °C).

2.1 Реактивы

2.1.1 Фосфорная кислота, 85 % (H_3PO_4) (ρ_{20} = 1.71 г/мл).

2.1.2 Раствор перекиси водорода, 9.1 г H_2O_2/литр (три объема).

2.1.3 Реагенты-индикаторы:

метиловый красный ..... 100 мг
метиленовый синий ..... 50 мг
спирт 50 % об ..... 100 мл

2.1.4 Раствор гидроксида натрия (NaOH), 0.01 M.

2.2 Аппаратура

2.2.1 Используемый аппарат должен соответствовать приведенной ниже схеме, особенно в отношении конденсатора.

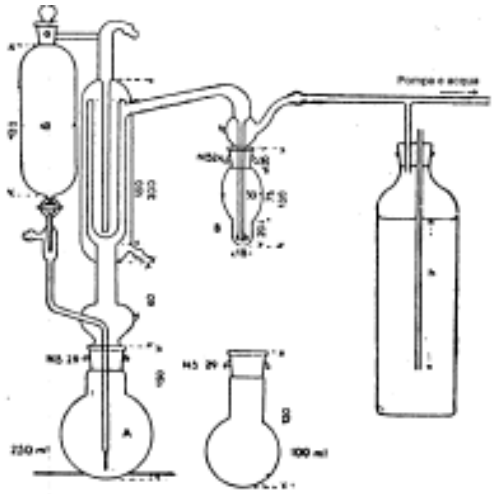


Рис. 1 Размеры указаны в миллиметрах. Внутренние диаметры четырех концентрических трубок, образующих конденсатор, составляют 45, 34, 27 и 10 мм.

Трубка подачи газа в барботер B заканчивается небольшой сферой диаметром 1 см с 20 отверстиями диаметром 0,2 мм по наибольшей горизонтальной окружности. В качестве альтернативы данная трубка может заканчиваться стеклянной пластиной с фриттой, которая производит большое количество очень мелких пузырьков и тем самым обеспечивает хороший контакт между жидкой и газообразной фазами.

Поток газа через аппарат должен составлять примерно 40 литров в час. Бутылка в правой части диаграммы предназначена для ограничения снижения давления, создаваемого водяным насосом, до 20-30 см вод. ст. Чтобы регулировать вакуум до нужного значения, между барботером и бутылкой следует установить расходомер с полукапиллярной трубкой.

2.2.2 Микробюретка.

3. Проведение исследования

3.1 Для ректифицированного концентрированного сусла используют раствор, полученный путем разбавления анализируемого образца до 40 % (м/об), как указано в главе «Общая кислотность», раздел 5.1. Вносят 50 мл этого раствора и 5 мл фосфорной кислоты (2.2.1) в колбу A аппарата для захвата объемом 250 мл.

3.2 Помещают 2-3 мл раствора перекиси водорода (2.2.2) в барботер Б, нейтрализуют 0,01 М раствором гидроксида натрия (2.2.4) и доводят сусло в колбе А до кипения, используя небольшое пламя высотой 4-5 см, которое должно непосредственно касаться дна колбы. Ставят колбу не на металлическую пластину, а на диск с отверстием диаметром около 30 мм. Это необходимо для того, чтобы избежать перегрева веществ, выделенных из образца, которые оседают на стенках колбы.

Поддерживают кипение, пропуская поток воздуха (или азота). В течение 15 минут весь диоксид серы будет перенесен и окислен. Определяют количество образовавшейся серной кислоты путем титрования 0,01 М раствором гидроксида натрия (2.2.4).

Пусть n мл - используемый объем.

4. Расчеты

Общий диоксид серы в миллиграммах на килограмм общего сахара (50 мл подготовленного образца для испытаний (3.1):

(1600 x n)/P

где P = процентная концентрация (м/м) общего количества сахаров

5. Выражение результатов

Общий диоксид серы выражают в мг/кг общего количества сахаров.

6. Характеристики точности метода (прецизионность)

Повторяемость (r)

50 мл испытуемого образца < 50 мг/л; r = 1 x 250/P мг/кг общих сахаров

Воспроизводимость (R)
50 мл испытуемого образца < 50 мг/л; R = 9 x 250/P мг/кг общих сахаров

Метод OIV-MA-F1-08 Метод IV типа

Хроматические свойства

(Резолюция Oeno 419A-2011)

1. Сущность метода

Поглощение ректифицированного концентрированного сусла измеряется при 425 нм через длину пути 1 см после разбавления для доведения концентрации сахара до 25 % (м/м) (25° Вх).

2. Аппаратура

2.1 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения в диапазоне от 300 до 700 нм.
2.2 Стеклянные ячейки с оптическим путем 1 см.
2.3 Мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм.

3. Проведение исследования

3.1 Подготовка анализируемого образца
Используют раствор с концентрацией сахара 25 % (м/м) (25° Вх), приготовленный, как описано в главе «pH», раздел 4.1. Фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.
3.2 Определение абсорбции
Обнуляют шкалу абсорбции при длине волны 425 нм, используя кювету с оптическим путем 1 см, содержащую дистиллированную воду.

Измеряют поглощение A при той же длине волны раствора, содержащего 25% сахара (25° Вх), приготовленного как в п. 3.1 и помещенного в ячейку с оптическим путем 1 см.

4. Выражение результатов

Поглощение при 425 нм ректифицированного концентрированного сусла в растворе с 25 % сахара (25° Вх) приводят с точностью до двух знаков после запятой.

Повторяемость(r)

$r = 0.01\ AU$ *при* $25°Bx$

Метод OIV-MA-F1-09 Метод I типа

Специфические методы анализа виноградного сахара

(Резолюция Oeno 419B/2012)

ПРИЛОЖЕНИЕ A: ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО КАТИОНОВ

1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Испытуемый образец обрабатывается сильнокислотным катионообменником. Катионы обмениваются на H^+. Общее количество катионов выражается разницей между общей кислотностью стоков и кислотностью испытуемого образца.

2. АППАРАТУРА

2.1. Стеклянная колонка внутренним диаметром 10 - 11 мм и длиной около 300 мм, снабженная сливным краном.

2.2. pH-метр со шкалой, градуированной не менее чем в 0,1 единиц pH.

2.3. Электроды:

– стеклянный электрод, хранящийся в дистиллированной воде,

– каломельный/насыщенный хлоридом калия электрод сравнения, выдерживаемый в насыщенном растворе хлорида калия,

– или комбинированный электрод, хранящийся в дистиллированной воде.

3. РЕАКТИВЫ

3.1. Сильнокислая катионообменная смола в H^+ форме, предварительно набухшая путем замачивания в воде на ночь.

3.2. Раствор гидроксида натрия, 0.1 М.

3.3. Бумажный индикатор pH.

3.4 Используемая вода должна быть очищенной водой для лабораторий, с удельной проводимостью ниже 2 мкСм$^{-1}$ при 20°C, например, вода EN ISO 3696 тип II.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

pH-метр должен быть откалиброван в соответствии с методом OIV MAAS313-15

4.1. Подготовка анализируемого образца

Используют раствор, полученный путем разбавления ректифицированного концентрированного сусла до 40% (м/об). Вносят 200 г точно взвешенного ректифицированного концентрированного сусла. Доводят до метки 500 мл воды. Гомогенизируют.

4.2 Общая кислотность ректификованного концентрированного сусла

Титрируют кислотность концентрированного сусла в 100 мл образца, приготовленного как в п. 4.1, 0,1 М раствором гидроксида натрия до тех пор, пока pH не станет равным 7 при 20°C. Щелочной раствор следует добавлять медленно, непрерывно встряхивая раствор. Пусть n1 мл - объем используемого 0,1 М раствора гидроксида натрия.

4.3. Подготовка ионообменной колонки

Вносят в колонку примерно 10 мл предварительно набухшего ионообменника в форме H^+. Промывают колонку дистиллированной водой до полного удаления кислотности, используя для контроля бумажный индикатор.

4.4. Ионный обмен

Пропускают через колонку 100 мл ректифицированного концентрированного раствора сусла, приготовленного как в пункте 4.1, со скоростью одна капля в секунду. Собирают сток в стакан. Промывают колонку 50 мл дистиллированной воды. Титрируют кислотность в стоках (включая промывную воду) 0,1 М раствором гидроксида натрия, пока pH не станет равным 7 при 20°C. Щелочной раствор следует добавлять медленно и постоянно встряхивать раствор. Пусть n2 мл - это объем используемого 0,1 М раствора гидроксида натрия.

5. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Общее количество катионов выражают в миллиэквивалентах на килограмм общего сахара с точностью до одного десятичного знака.

5.1. Расчеты

– Общая кислотность ректифицированного концентрированного сусла в миллиэквивалентах на килограмм:

$$a = 2.5\ n1$$

– Кислотность стоков, выраженная в миллиэквивалентах на килограмм ректифицированного концентрированного сусла:

$$E = 2.5\ n2.$$

– Общее количество катионов в миллиэквивалентах на килограмм общего количества сахаров:

((n2 – n1) / (P)) x 250

P = процентная концентрация (м/м) общего количества сахаров.

5.2 Повторяемость (r)

r = 0.3

Метод OIV-MA-F1-10 Метод IV типа

Специфические методы анализа виноградного сахара

(Резолюция Oeno 419B/2012)

ПРИЛОЖЕНИЕ D: ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

D.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ СВИНЦА С ПОМОЩЬЮ ЭТААС

Тяжелые металлы подробно описаны в шагах по подготовке образцов виноградного сахара (концентрированного сусла и ректифицированного концентрированного сусла) для определения содержания свинца.

Приборы и компьютерные инструменты, используемые в испытательных лабораториях, различаются и меняются.

В связи с этим приведены общие критерии калибровки и метрики.

Предупреждение

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ - Операторы должны защищать руки и глаза при работе с кислотами. Работа с кислотами должна проводиться в соответствующем вытяжном шкафу.

Область применения

Настоящий метод устанавливает метод электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии (ЭТААС) для определения содержания свинца в ректифицированных концентрированных суслах в диапазоне от 10 мкг/кг до 200 мкг/кг.

Нормативные ссылки

ISO 3696, вода для аналитических лабораторий - Спецификация и методы испытаний.

Сущность метода

В электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии (ЭТААС) объем образца помещается в графитовую трубку, которая может нагреваться до температуры более 2800°C. При постепенном повышении температуры матрица образца высыхает, происходит термическое разложение и диссоциация. Для большинства элементов высота пика пропорциональна концентрации элемента в растворе, хотя в очень многих случаях предпочтительнее работать с площадью пика.

Реагенты и растворы

Если не указано иное, используют только бессвинцовые реагенты признанного аналитического качества.

5.1 Деминерализованная, сверхчистая вода с удельным сопротивлением выше 18 М Ом, в соответствии с ISO 3696.

5.2 Азотная кислота концентрации выше 60% (нормативное качество).

5.3 Дигидроортофосфат аммония $NH_4H_2PO_4$

5.4 Матричный модификатор: $NH_4H_2PO_4$, 6% раствор.

Наливают 3 г $NH_4H_2PO_4$ в волюметрическую колбу на 50 мл. Растворяют и доводят до объема деминерализованной водой.

5.5 Нитрат магния $Mg(NO_3)_2$ к 6 молекулам воды.

5.6 0.5% раствор нитрата магния (хранить в холодильнике).

Насыпают 0,5 г нитрата магния в волюметрическую колбу на 100 мл. Растворяют и доводят до объема деминерализованной водой. Данный раствор хранят в холодильнике не более 15-20 дней.

5.7 Сертифицированный раствор(ы) моноэлементного свинца (при 1000 мг/л).

5.8 10 мг/л раствор свинца.

Помещают 1 мл исходного раствора (5.7) и 10 мл азотной кислоты (5.2) в колбу емкостью 100 мл. Доводят до объема сверхчистой водой (5.1).

5.9 100 мкг/л раствора свинца.

Помещают 1 мл исходного раствора (5.8) в колбу емкостью 100 мл. Добавляют 10 мл азотной кислоты (5.2). Доводят до объема сверхчистой водой (5.1).

5.10 Тритон X-100 (1% об/об)

5.11 Холостое испытание: 10% азотная кислота.

Подготовка калибровочного диапазона

Количество калибровочных растворов зависит от требуемой точности. Требуется не менее пяти стандартов. Точность и достоверность результатов могут быть проверены путем анализа контрольного образца.

Следует подчеркнуть, что линейность калибровочной кривой часто ограничена.

Корректируют значения абсорбции калибровочных растворов, вычтя значение абсорбции холостого испытания. Для построения калибровочной кривой или расчета калибровочной функции используют полученные значения, а также концентрацию аналита в калибровочных растворах.

В зависимости от типа аппарата, можно использовать автодозатор для прямого введения заранее определенных объемов из раствора 100 мкг/л, чтобы иметь диапазон калибровки от 0 до 100 мкг/л (например, 0, 10, 25, 50, 100 мкг/л). Также можно готовить калибровочные растворы отдельно.

Примечание 1: Для определения содержания свинца более 100 мкг/л можно использовать меньший объем тестового образца.

6. Аппаратура и оборудование

6.1 Атомно-абсорбционный спектрометр, оснащенный электротермическим атомизатором, лампой с полым катодом, приспособленной для работы со свинцом при токе, рекомендованном производителем, устройством автоматической коррекции фонового шума и компьютерной системой считывания или высокоскоростным графическим регистратором. При электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии следует использовать коррекцию фонового шума. Минимально приемлемая техническая характеристика основана на дейтерии. Коррекция зеемановского фонового шума предпочтительнее, если сигнал от фонового шума высок. Для увеличения отношения сигнал/шум аналита рекомендуется использовать графитовую трубку с пиролитической платформой.

Примечание 2: для свинца можно использовать длину волны 217,0 нм. Чувствительность примерно в два раза выше, чем при 283,3 нм. Однако, поскольку шум и риск интерференций выше, необходимо работать с системой коррекции зеемановского фонового шума.

6.2 Прецизионные весы с точностью до 0,1 мг

6.3 Градуированные пипетки класса A: 0,5 мл, 1 мл, 5 мл

6.4 Волюметрические колбы класса A: 50 мл и 100 мл

Примечание 3: *материал, контактирующий с образцом, должен находиться в 10%-ном растворе азотной кислоты (5.2) не менее 12 часов и затем должен быть несколько раз промыт деминерализованной водой (5.1).*

7. Отбор проб

Подготовка образца к испытанию

В колбу на 50 мл (6.4) насыпают 10 г образца с точностью до 0,1 мг, 5 мл азотной кислоты (5.2) и 0,5 мл тритона X-100 (1% об/об) (5.10). Доводят до 50 мл деминерализованной водой (5.1) и гомогенизируют.

8. Проведение исследования

Регулируют инструментальные параметры и выравнивают электротермический распылитель в соответствии с инструкциями производителя, чтобы получить максимальную пользу от системы коррекции фонового шума. Аналогичным образом регулируют пробоотборник. Определяют оптимальные параметры электротермического распылителя для конкретного типа распылителя и объема пробы в соответствии с рекомендациями производителя прибора, чтобы охватить оптимальный диапазон измерений. Регулируют базовую линию прибора на нуль. Проверяют стабильность нуля в системе атомизации, выполнив заданную программу температурного нагрева графитового атомизатора. Могут быть использованы следующие настройки печи:

фаза	температура (°C)	выравнивание (с)	нагрев (°C/с)	вид газа	скорость газа (л/мн)	считывание
1	130	15	10	аргон	0.2	нет
2	350	5	25	аргон	0.2	нет
3	500	5	50	аргон	0.2	нет
4	750	10	100	аргон	0.2	нет
5	1900	3	0	аргон	останов влено	да
6	2500	3	0	аргон	0.2	нет
7	100	10	0	аргон	0.2	нет

Используя автодозатор, вносят заданный объем раствора. Добавляют заданный объем раствора модификатора и распыляют холостой тест (5.11), калибровочные растворы и разбавленные растворы тестовых проб в порядке возрастания отклика аппарата. Если высота пика (или площадь пика) испытуемого образца больше, чем значение калибровочного раствора с самой высокой концентрацией, необходимо использовать меньший объем испытуемого образца.

Внешняя калибровка

В качестве примера приводится следующая программа для пробоотборника (объем в мкл) для определения содержания свинца путем внешней калибровки.

	холостой тест	проба	стандарт 1 10 мкг/л	стандарт 2 25 мкг/л	стандарт 3 50 мкг/л	стандарт 4 100 мкг/л
заготовка (HNO_3 10%)	5.0					
разбавитель (HNO, 10%)			4.5	3.7	2.5	0
проба		5.0				
стандартный раствор (Pb 100 мкг/л)			0.5	1.3	2.5	5.0
$NH_4H_2PO_4$ 6%	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
$Mg(NO_3)_2$ 0.5%	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
общий объем	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0

Распыляют каждый раствор не менее двух раз и, если воспроизводимость приемлема в соответствии с используемой в лаборатории системой контроля качества, рассчитывают среднее значение показаний. При необходимости обнуляют базовую линию.

Метод добавления

Также можно использовать метод добавления для уменьшения влияния неспектральных интерференций между стандартами и образцами, при условии, что калибровочная кривая линейна в используемом диапазоне поглощения.

Переносят одинаковые объемы исследуемой пробы в три сосуда (например, чашки автодозатора). В два из сосудов добавляют небольшое количество стандартного раствора, рассчитанное таким

образом, чтобы получить концентрацию для образцов, соответственно, от 100% до 200% выше, чем концентрация в исходном образце. Добавляют такое же количество воды в третий сосуд. Тщательно перемешивают растворы. Измеряют интегральную абсорбцию каждого раствора и строят кривую с добавленной концентрацией по оси x и измеренной абсорбцией по оси y. Аналогичным образом определяют концентрацию аналита в холостом растворе реагента или холостом растворе теста.

В качестве примера приводится следующая программа для пробоотборника (объем в мкл) для определения содержания свинца методом добавления.

	холостой тест	проба	добавка 1 25 мкг/л	добавка 2 50 мкг/л
заготовка (HNO_3 10%)	5.0			
разбавитель (HNO, 10%)	2.5	2.5	1.2	0
проба		5.0	5.0	5.0
стандартный раствор (Pb 100 мкг/л)			1.3	2.5
NH4H2PO4 6 %	1.0	1.0	1.0	1.0
$Mg(NO_3)2$ 0.5%	2.0	2.0	2.0	2.0
общий объем	10.5	10.5	10.5	10.5

9. Расчеты

Программное обеспечение аппарата строит калибровочный график (поглощение в зависимости от концентрации свинца в мкг/л). Это дает концентрацию свинца в образцах. При необходимости учитывают разбавление.

10. Характеристики точности метода (прецизионность)

Для концентрации свинца ниже 150 мкг/кг:
r (Повторяемость) = 15 мкг/кг
R (Воспроизводимость) = 25 мкг/кг

11. Библиография

13.1 Laboratoire SCL33. *Détermination du plomb dans le vin par atomic absorption spectrometry (four-graphite)*. Manuel d'instructions, 2010.

13.2 Laboratoire SCL33. *Détermination du plomb dans les aliments solides par atomic absorption spectrometry (four-graphite)*. Manuel d'instructions, 2010.

13.3 Rodriguez Garcia J.C. *Desarrollo de metodologías para la determinación de metales en miel mediante ETAAS y estudio quimiométrico de su empleo como bioindicador*. Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Ciencias, Campus de Lugo, 2006.

Метод OIV-MA-F1-11 Метод IV типа

Специфические методы анализа виноградного сахара

(Резолюция Oeno 419B/2012)

ПРИЛОЖЕНИЕ D.2: ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Определение содержания свинца методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS).

Анализ Pb в ректифицированном концентрированном виноградном сусле также может быть выполнен с применением метода **OIV/OENO344/2010** (Многоэлементный анализ с использованием ICP-MS), с добавлением следующего изменения в конце пункта Nº5 (Подготовка пробы):

5. ПОДГОТОВКА ПРОБЫ

Данный метод также может быть применен для анализа Pb в ректифицированных концентрированных виноградных суслах. Для этого необходима предварительная минерализация пробы. Рекомендуется проводить сбраживание проб в микроволновой системе в тесном сосуде. В качестве примера приводится следующая процедура:

Помещают 1 г сусла, 2 мл азотной кислоты (3.4) и 8 мл воды (3.1) в сосуд для микроволновой печи и применяют следующую программу микроволнового сбраживания:

Стадия	Нагрев	ºC	Удержание
1	20 мин	200	20 мин

После того, как образцы сброжены, их переносят в 50 мл пластиковую пробирку (4.6), разбавляют водой (3.1) до 30 г и гомогенизируют.

СБОРНИК МЕЖДУНАРОДНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА – МОВВ

Специфические методы анализа виноградного сахара

OIV-MA-F1-11 : 2012

Метод OIV-MA-F1-12 Метод II типа

Специфические методы анализа виноградного сахара

(Резолюция Oeno 419C/2015)

Определение содержания мезо-инозитола, сцилло-инозитола и сахарозы

1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Ректифицированное концентрированное сусло (РКС) состоит в основном из сахаров, полиспиртов и воды, содержащихся в винограде. Все остальные органические и минеральные компоненты удаляются в процессе ректификации.

Мезо-инозитол, сцилло-инозитол и сахароза определяются с помощью газовой хроматографии (ГХ) после силанизации.

Сахароза, возможно, содержащаяся в небольших количествах в РКС, стабильна в течение нескольких месяцев, поскольку гидролиз значительно замедлен из-за отсутствия органических и минеральных кислот, которые удаляются в процессе ректификации, очень низкого содержания воды и высокого содержания глюкозы и фруктозы.

2. РЕАКТИВЫ

2.1 Ксилитол (CAS 87-99-0)

Внутренний стандарт: (подготовленный водный раствор с точно известной концентрацией около 10 г/л).

2.2 Мезо-инозитол ($C_6H_{12}O_6$) (CAS 87-89-8).

2.3 Сцилло-инозитол ($C_6H_{12}O_6$) (CAS 488-59-5).

2.4 Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$), фруктоза ($C_6H_{12}O_6$), сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$).

2.5 Бис (триметилсилил) трифторацетамид - (BSTFA) – ($C_8H_{18}F_3NOSi_2$) (CAS 25561-30-2).

Предупреждение: Это опасный и легковоспламеняющийся продукт. Воспламеняющиеся жидкости и пары могут спровоцировать серьезные ожоги кожи и серьезные поражения глаз. Необходимо надеть перчатки/защитную одежду. Защитить глаза/лицо.

2.6 Триметилхлорсилан (C_3H_9ClSi) – TMCS – (CAS 75-77-4).

Предупреждение: Это опасный и легковоспламеняющийся продукт. Вреден для кожи. Провоцирует серьезные ожоги кожи и серьезные поражения глаз. Токсичен при вдыхании. Может раздражать дыхательные пути. Держать вдали от источников тепла/ искр/ свободного пламени/ нагретых поверхностей. Не курить. Избегать вдыхания паров. Надевать перчатки/защитную одежду. Защитить глаза/лицо.

2.7 Пиридин р.а. (C_5H_5N) (CAS 110-86-1).

Предупреждение: Это опасный и легковоспламеняющийся продукт. Опасен при вдыхании, контакте с кожей и при проглатывании.

2.8 Абсолютный спирт (C_2H_6O) (CAS 64-17-5).

Предупреждение: Это легко воспламеняющийся продукт. Жидкость и пары легко воспламеняются. Держать вдали от источников тепла/искр/ свободного пламени/нагретых поверхностей. Не курить.

2.9 Вода 1 типа в соответствии со стандартом ISO 3696 или деионизированная вода с удельным сопротивлением ≥ 18 М Ом·см.

2.10 Силанизирующий реагент также доступен в готовых к использованию наборах (например, HMDS+TMSCl+Pyridine 3:1:9 Supelco cod. 33038)

2.11 Технические газы: азот, водород, гелий и воздух для газовой хроматографии и для фаз дегидратации.

3. АППАРАТУРА

3.1 Газовый хроматограф

3.2 Капиллярная колонка, способная гарантировать минимальную эффективность N=250 000 прокладок/колонна для сахарозы при 1 г/л

Например, OV-1 (25 м x 0.30 мм x 0.15 мкм) или DB-5 (60 м x 0.25 мм x 0.10 мкм).

Условия эксплуатации (только в качестве примера):

газ-носитель: чистый водород или гелий, для газовой хроматографии,

Водород: *Внимание: Это чрезвычайно воспламеняющийся газ. Хранят контейнер в хорошо проветриваемом месте, вдали от пламени и искр. - Не курят. Избегают накопления электростатических зарядов.*

скорость потока газа-носителя: около 2 мл/мин,
температура инжектора: 250 °C,
температура пламенно-ионизационного детектора (ПИД): 300 °C,

программирование температуры: 1 минута при 160 °C, 4 °C в минуту до 260 °C, постоянная температура 260 °C в течение 15 минут,

соотношение разделителей: примерно 1:20,

вспомогательные газы: чистый водород и воздух для газовой хроматографии.

3.3 Интегратор

3.4 Микрошприц: 10 мкл

3.5 Микропипетки: 10, 100, 400 и 1000 мкл

3.6 Колбы объемом 2 мл с тефлоновой пробкой

3.7 Печь

3.8 Технические весы, аналитические весы, способные обеспечить точность ± 0,1 мг

3.9 Колбы объемом 50 и 100 мл

3.10 Сушильный шкаф

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Подготовка анализируемого образца

В колбе емкостью 50 мл взвешивают количество “p” ректифицированного концентрированного сусла массой от 4,9 до 5,1 г, отмечая вес вещества с точностью ±0,1 мг.

Затем добавляют 1 мл стандартного раствора ксилитола (2.1) и доводят до объема водой (2.9).

4.2 Дегидратация образца

После перемешивания отбирают 100 мкл раствора и помещают в колбу (3.6), где его сушат под легким потоком азота.

Для облегчения выпаривания можно добавить 100 мкл абсолютного спирта (2.8).

Примечание 1: Если требуется точная доза сахарозы, то разбавленный раствор следует готовить непосредственно перед силанизацией, чтобы ограничить гидролиз сахарозы в разбавленном водном растворе.

Примечание 2: Повторные измерения содержания сахарозы должны проводиться на разбавленных растворах,

приготовленных каждый раз перед каждым силанизированием.

4.3 Дериватизация

Остаток осторожно растворяют в 100 мкл пиридина (2.7) и добавляют 100 мкл бис (триметилсилил)трифторацетамида (2.5) и 10 мкл триметилхлорсилана (2.6). Колбу закрывают тефлоновой пробкой и помещают в печь при 70 °C на 70 минут.

Вынимают герметичные колбы из печи и оставляют охлаждаться в сушильном шкафу в темноте при комнатной температуре в течение часа перед введением в газовый хроматограф.

Вещество, законсервированное в герметичной колбе и хранящееся в сушильном шкафе в темноте при комнатной температуре, стабильно в течение трех дней.

Примечание 3: При работе с набором для силанизации следует использовать 400 мкл реагента на 100 мкл обезвоженного и разбавленного образца, как описано в п. 4.1.

Примечание 4: Силанизация считается успешной, если раствор после единственной фазы имеет прозрачный вид или оставляет легкий белый осадок. Не должно быть темного осадка, так как это указывает на избыток не дериватизированного сахара или старое силанизирующее вещество.

Примечание 5: Если образуется белая суспензия, подождите, пока твердое вещество не осядет на дно, не центрифугируя.

4.4 Газохроматографический анализ

1 мкл отбирают шприцем (3.4) и вносят в хроматограф с помощью вышеупомянутого разделителя.

Хроматограмма должна показывать не слияние пиков (признак плохо проведенного силанизирования), а характерные пики, как показано на прилагаемых рисунках. (Рис.9-Рис.12).

4.5 Критерии интеграции пиков

Интегрируют газохроматографические пики относительно горизонтальной базовой линии. В случае пиков, которые не являются идеально разрешенными, прослеживают горизонтальную базовую линию, начиная с более глубоких долин, которые ограничивают пик рассматриваемого пика. Проводят вертикальную линию вниз, начиная от долин пиков до базовой линии, чтобы определить площадь пика.

Метод интегрирования «долина-долина» не используется.

Пример применения этих критериев приведен на рисунке 10 для внутреннего стандарта, на рисунке 11 для инозитолов и на рисунке 12 для сахарозы.

Примечание 6: Если требуется точная доза сахарозы, важно соблюдать критерии интеграции, описанные в пункте 4.4. и показанные на рисунке 4.

5. РАСЧЕТЫ

5.1 Расчет коэффициентов реагирования

Примечание: вместо расчета коэффициентов отклика может быть использована калибровочная кривая.

5.1.1 Готовится раствор, содержащий:

- 60 г/л глюкозы,
- 60 г/л фруктозы,
- 1 г/л мезо-инозитола,
- 1 г/л сахарозы,

(взвешивают 60 г глюкозы и 60 г фруктозы с точностью ±1 г; затем 1 г мезо-инозитола и 1 г сахарозы с точностью ±0,1 мг) и, наконец, доводят до объема 1 л водой.

5.1.2 Силанизация эталонного раствора

Проводят операции, описанные в пункте 4.1, начиная с 5 мл указанного раствора вместо 5 г РКС.

Берут 5 мл раствора и действуют, как указано в пункте 4.

5.1.3 Факторы газохроматографической реакции

Результаты для мезо-инозитола и сахарозы по отношению к ксилитолу рассчитывают по хроматограмме.

В случае сцилло-инозитола, время удерживания которого лежит между последним пиком аномерной формы глюкозы и пиком мезо-инозитола (см. рис. 11), используют те же коэффициенты реакции, что и для мезо-инозитола.

Где: $A_{meso\text{-}inositol}$ = площадь пика мезо-инозитола; $A_{sucrose}$ = площадь пика сахарозы; A_{is} = площадь пика внутреннего стандарта; $C_{meso\text{-}inositol}$ = концентрация мезо-инозитола в мг/л; $C_{sucrose}$ = концентрация сахарозы в мг/л; C_{is} = концентрация внутреннего стандарта в мг/л; верна следующая формула:

$$RF_{meso-inositol} = \frac{A_{meso-inositol}}{A_{is}} \times \frac{C_{is}}{C_{meso-inositol}}$$

$$RF_{sucrose} = \frac{A_{sucrose}}{A_{is}} \times \frac{C_{is}}{C_{sucrose}}$$

Решение для расчета коэффициентов реагирования должно быть подготовлено и проанализировано в тот же день (см. примечание 1 к параграфу 4.1).

5.2 Формулировка результатов

Мезо-инозитол, сцилло-инозитол и сахарозу выражают в мг/кг общего количества сахаров (mg/kg TS) без десятичных знаков.

5.2.1 Концентрации, выраженные в мг/л для 10% мас/об) раствора ректифицированного концентрированного сусла (4.1):

$$C_{meso-inositol}\left(\frac{mg}{l}\right) = \frac{C_{is}}{RF_{meso-inositol}} \times \frac{A_{meso-inositol}}{A_{is}}$$

$$C_{sucrose}\left(\frac{mg}{l}\right) = \frac{C_{is}}{RF_{sucrose}} \times \frac{A_{sucrose}}{A_{is}}$$

5.2.2 Концентрации, выраженные в мг/кг общего количества сахаров (mg/kg TS) для мезо-инозитола и сцилло-инозитола, а также для сахарозы в ректифицированном концентрированном сусле.

Обозначение знаком "i" любого из трех соединений:

$$CONC_i\left(\frac{mg}{kg\ TS}\right) = C_i \times \frac{5000}{w \times G}$$

Где "w" - взвешенное количество в г ректифицированного концентрированного сусла, а "G" - процентное содержание сахара в РКС, выраженное в °Вх [или % (м/м) сахарозы]. Процентное содержание сахара в образце ректифицированного концентрированного сусла следует измерять по методу OIV-MA-AS2-02.

6. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТОЧНОСТИ МЕТОДА (ПРЕЦИЗИОННОСТЬ)

6.1 Важнейшие пункты

Метод предназначен для анализа сахаров и полиспиртов, содержащихся в чрезвычайно малых количествах в матрице глюкозы и фруктозы в очень высоких концентрациях. Таким образом, необходимо проверить способность метода давать линейные результаты в предложенном диапазоне концентраций и достаточно точные по сравнению с известными значениями.

Кроме того, метод предусматривает газохроматографический анализ силанизированных соединений, полученных в результате дериватизации сахаров. Эти соединения чувствительны к влажности и со временем разрушаются. Поэтому важно проверить адекватность инструкций по сохранению и обращению с этими соединениями.

Наконец, сахароза подвержена гидролизу из-за количества остаточной воды в ректифицированном концентрированном сусле (от 30 до 45%). Однако низкая кислотность матрицы и высокая концентрация глюкозы и фруктозы замедляют процесс гидролиза и позволяют проводить точные измерения. Поэтому важно убедиться, что время анализа быстротечно по сравнению с гидролизом, чтобы обеспечить воспроизводимые измерения сахарозы.

6.2 Линейность

Была подготовлена серия из шести синтетических образцов (включая холостой), содержащих матрицу из глюкозы и фруктозы, полученную путем взвешивания равных количеств этих двух сахаров по отношению к 60% (мас/мас) содержанию общих сахаров в исходном ректифицированном концентрированном сусле.

К пяти из этих синтетических образцов были добавлены точные количества в возрастающих количествах мезо-инозитола и сахарозы так, чтобы достичь концентраций, показанных в следующей таблице:

	добавленная концентрация	
№	мезо-инозитол	сахароза
	(мг/кг общего кол-ва сахаров)	(мг/кг общего кол-ва сахаров)
1	0 (холостой)	0 (холостой)
2	214.7	427.3
3	420.0	857.7
4	840.2	1675.8
5	1727.0	3338.0
6	2514.0	6719.0

Затем образцы разбавляли (4.1), разбавленный раствор обезвоживали (4.2), силанизировали (4.3) и анализировали с помощью ГХ (4.4-4.5).

Затем образцы были силанизированы и проанализированы с помощью ГХ. Результаты проверяли в порядке линейности,

показывая на графике соотношение площадей пиков мезо-инозитола и внутреннего стандарта A_{meso}/A_s, соотношение между концентрацией мезо-инозитола и внутреннего стандарта (в мг/л), указанного как C_{meso}/C_{is}. Газохроматографический анализ проводился дважды, и следующие данные относятся к среднему из двух значений.

Аналогичная обработка сахарозы проводилась следующим образом:

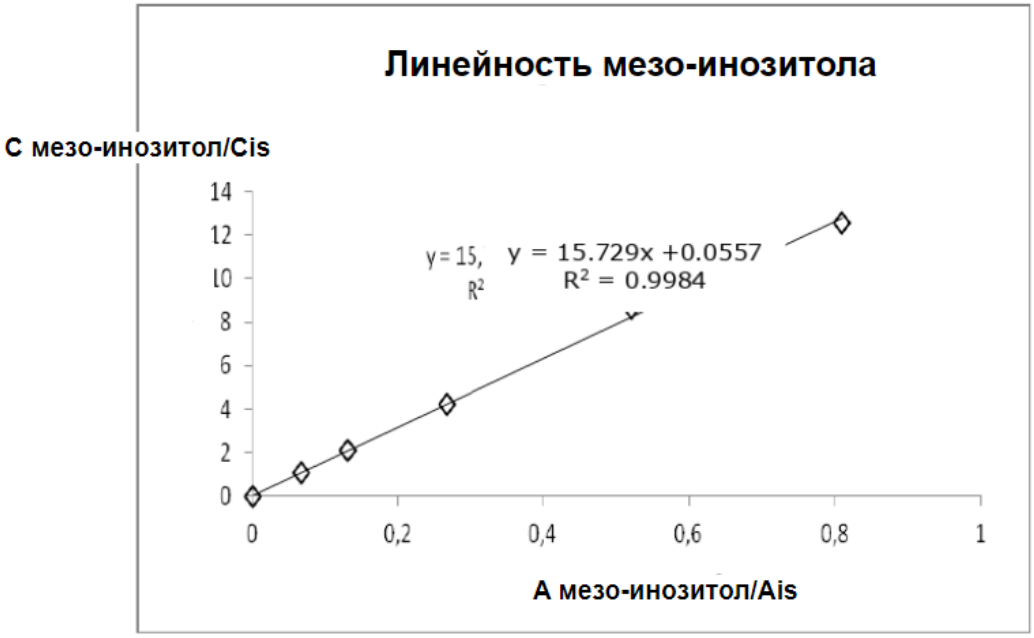


Рис. 1 Линейность мезо-инозитола

Линейность мезо-инозитола является весьма удовлетворительной (R>0,998) во всем исследованном диапазоне концентраций.

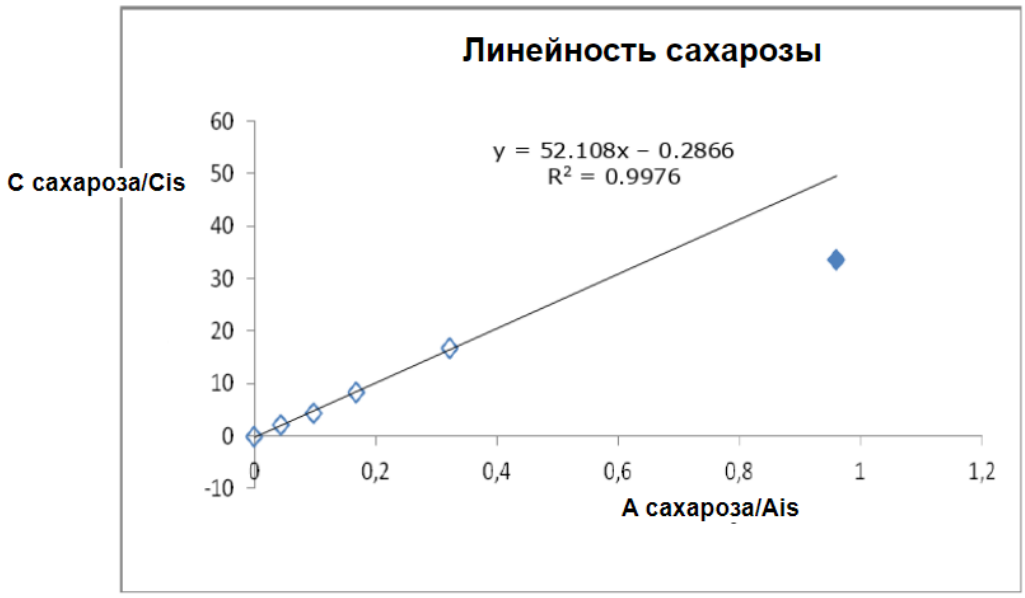


Рис. 2 Линейность сахарозы

Что касается сахарозы, то линейная зависимость, предполагаемая во всем диапазоне исследованных концентраций, не привела к удовлетворительной корреляции (R=0,967), но, сузив область линейности до синтетического образца № 5, корреляция стала сравнимой с таковой для мезо-инозитола (R>0,997).

Следуя инструкциям п. 5.1, были получены следующие коэффициенты отклика:

относительно мезо-инозитола/ксилитола I.S.	относительно сахарозы/ксилитола I.S.
1.04 ± 0.03 (в среднем ± σ; n=4)	0.36 ± 0.06 (в среднем ± σ; n=4)

6.3 Специфичность

Связь между добавленным мезо-инозитолом и определенным с помощью ГХ является линейной во всем исследованном диапазоне измерений, причем наклон линии очень близок к единице, а точка пересечения очень близок к нулю.

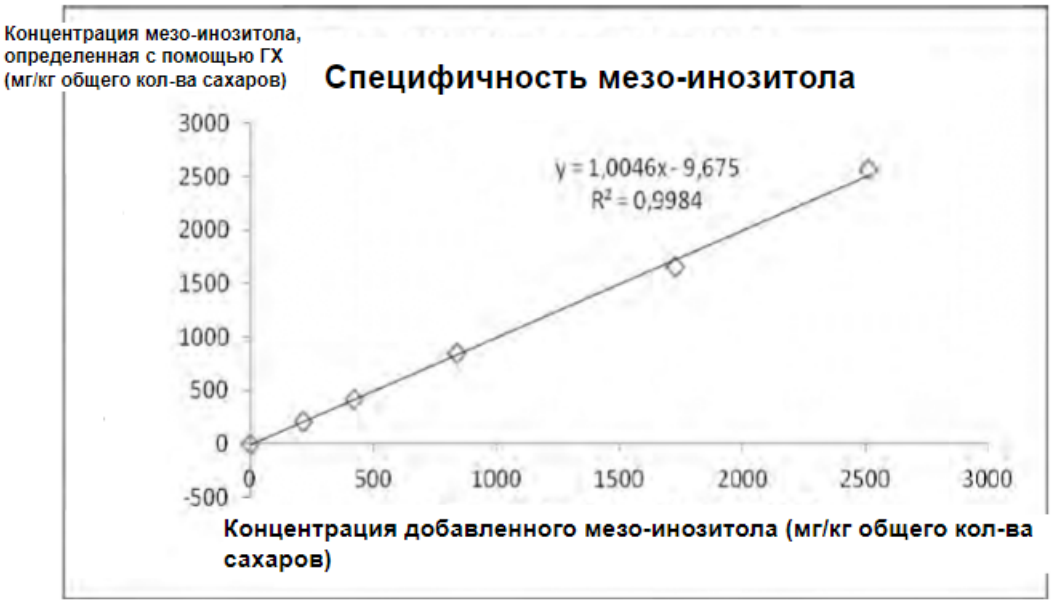


Рис. 3 Специфичность мезо-инозитола

Кроме того, восстановление удовлетворительное - от 95 до 105%, как видно из следующей таблицы:

Добавленный $C_{мезо\text{-}инозитол}$ (мг/кг общего кол-ва сахаров)	$C_{мезо\text{-}инозитол}$, определенный с помощью ГХ ±σ (n=2) (мг/кг общего кол-ва сахаров)	Восстановление (%)
0	0	-
214.7	213 ± 2	99%
420.0	419 ± 3	100%
840.2	852 ± 20	102%

1727.0	1668 ± 214	100%
2514.0	2587 ± 36	99%

Что касается специфичности сахарозы, концентрации, полученные при расчете добавленной сахарозы, и концентрации, определенные с помощью ГХ, соответствуют и находятся в линейной зависимости друг от друга, с наклоном, равным единице, и точкой пересечения, равной почти нулю, при условии, однако, что диапазон концентраций более ограничен по сравнению с исследованным.

Следующий график показывает, что линейная зависимость не распространяется до последнего уровня концентрации около 6700 мг/кг общего количества сахаров.

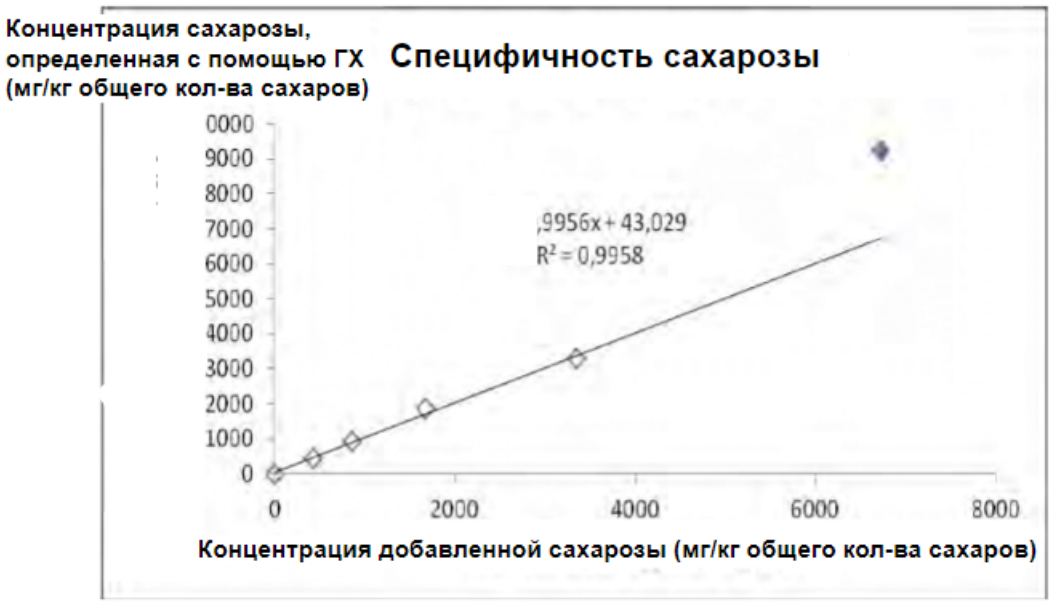


Рис. 4 Специфичность сахарозы

Восстановление также удовлетворительное - от 90 до 110%, за исключением более высоких уровней концентрации, как видно из следующей таблицы:

Добавленная $C_{сахароза}$ (мг/кг общего кол-ва сахаров)	$C_{сахароза}$, определенная с помощью ГХ ±σ (n=2) (мг/кг общего кол-ва сахаров)	Восстановление (%)
0	0	-
427.3	423 ± 16	99%
857.7	913 ± 37	107%
1675.8	1852 ± 344	111%
3338.0	3297 ± 284	99%
6719.0	*9220 ± 19*	*137%*

6.4 Стабильность сахарозы в ректифицированном концентрированном сусле

Образец ректифицированного концентрированного сусла с добавленной сахарозой хранился при комнатной температуре и анализировался через регулярные промежутки времени, чтобы увидеть проявление явления гидролиза сахарозы в ректифицированном концентрированном сусле.

Результаты обобщены в следующей таблице:

	t = 0 дней	t=9 дней	t=53 дней
Мезо-инозитол (мг/кг общего кол-ва сахаров)	2227	2100	2052
Сцилло-инозитол (мг/кг общего кол-ва сахаров)	424	430	394
Сахароза (мг/кг общего кол-ва сахаров)	4631	5108	4969

Как мезо-инозитол и сцилло-инозитол, так и сахароза не показывают значительных изменений в концентрации по сравнению с исходным значением до 53 дней после приготовления препарата.

Данный факт отображен на следующем графике:

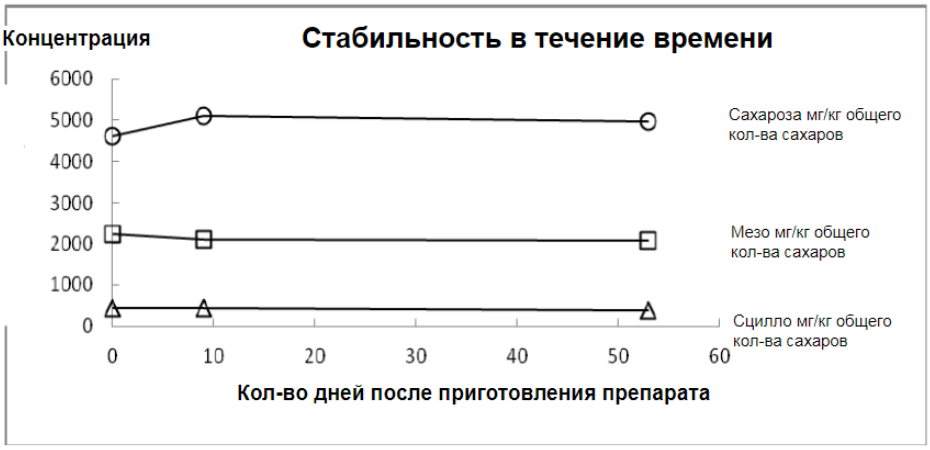


Рис. 5 Стабильность в течение времени

6.5 Стабильность силанизированного образца

Силанизированный продукт, полученный, как описано в пункте 4.2, был законсервирован, как описано в том же пункте. Через 24-часовые интервалы силанизированный образец анализировали с помощью газового хроматографа в соответствии с процедурой, изложенной в пункте 4.3 и последующих пунктах.

Результаты описаны в следующей таблице:

	t=0 в среднем ± SD (n=3)	t=24 ч в среднем ± SD (n=3)	t=48 ч в среднем ± SD (n=3)	t=72 ч в среднем ± SD (n=3)	t=96 ч в среднем ± SD (n=3)
Мезо-инозитол (мг/кг общего кол-ва сахаров)	2424 ± 109	2347 ± 44	2358 ± 17	2453 ± 39	2478 ± 15
Сцилло-инозитол (мг/кг общего кол-ва сахаров)	261 ± 7	254 ± 2	256 ± 4	257 ± 3	264 ± 1
Сахароза (мг/кг общего кол-ва сахаров)	6233 ± 971	6500 ± 200	6633 ± 58	6733 ± 321	6600 ± 436

Нет существенных различий между результатами, полученными из одного и того же силанизированного образца в течение 4 дней после силанизации при соблюдении мер по сохранению силанизированного образца, описанных в пункте 4.2.

Данный факт виден на следующих графиках:

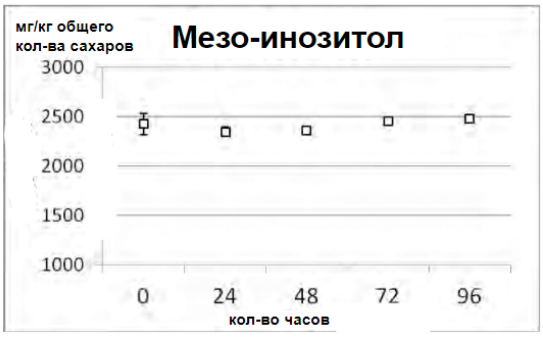


Рис. 6 Стабильность мезо-инозитола

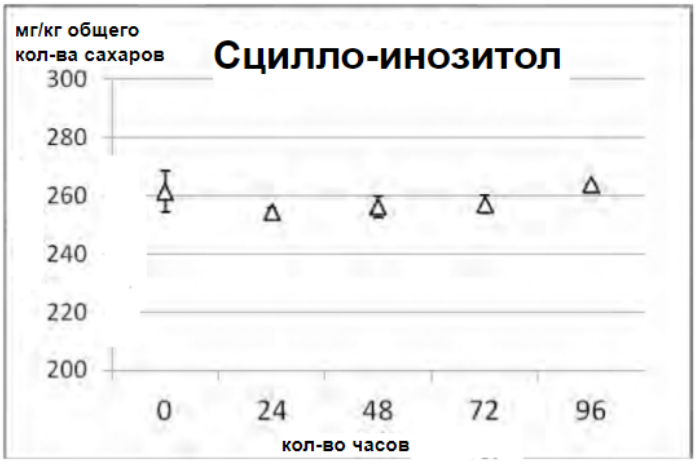


Рис. 7 Стабильность сцилло-инозитола

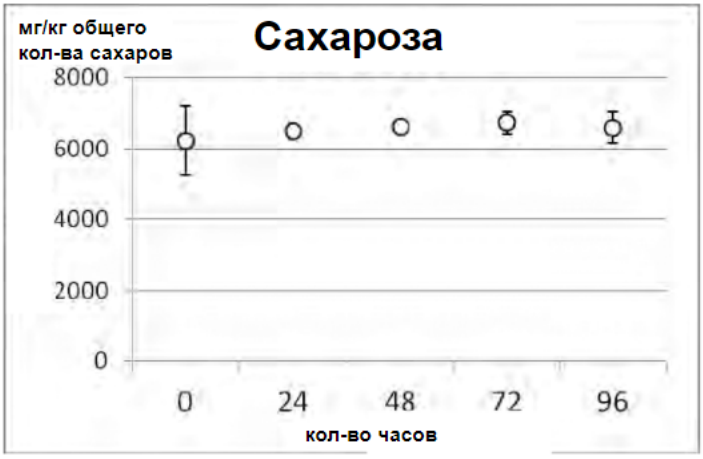


Рис. 8 Стабильность сахарозы

6.6 Характеристики точности метода (прецизионность)

Параметры точности, полученные в ходе межлабораторного испытания, проведенного в апреле 2014 года между 8 итальянскими лабораториями. Кольцевой тест проводился на образце с добавлением сахарозы в концентрации 1 г сахарозы/1 кг ректифицированного концентрированного сусла.

	сахароза	мезо-инозитол	сцилло-инозитол
Количество участвующих лабораторий	8	8	8
Количество принятых результатов тестирования	23	23	23
Средние значения (мг/кг общего кол-ва сахаров)	1665	954	145
Повторяемость			
Стандартное отклонение повторяемости (Sr)	78	52	11
Относительное стандартное отклонение повторяемости (% RSD_r)	4.7	5.4	7.3
Предел повторяемости (r)	219	146	29
HORRAT r = RSD_r/RSD (R)	0.9	1.0	1.0
Воспроизводимость			
Стандартное отклонение воспроизводимости (SR)	122	76	19
Относительное стандартное отклонение в условиях воспроизводимости (% RSD_R)	7.4	8.0	13
Предел воспроизводимости (R)	343	213	55
RSD(R) Horwitz %	5.2	5.7	7.6
HORRAT R = RSD_R/RSD (R)	1.4	1.4	1.8
S_r/S_R	0.64	0.68	0.58

7. БИБЛИОГРАФИЯ

7.1 Versini G., Dalla Serra A. and Margheri G. (1984). *Polialcooli e zuccheri minori nei mosti concentrati rettificati. Possibili parametri di genuinità?* Vignevini, 11(3), 41-47

7.2 Monetti A., Versini G., Dalpiaz G. and Raniero F. (1996). *Sugar adulterations control in concentrated rectified grape musts by finite mixture distribution analysis of the myo-inositol and scyllo-insitol content and the D/H methyl ratio of fermentative ethanol*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44-8: 2194-2210.

8. РИСУНКИ

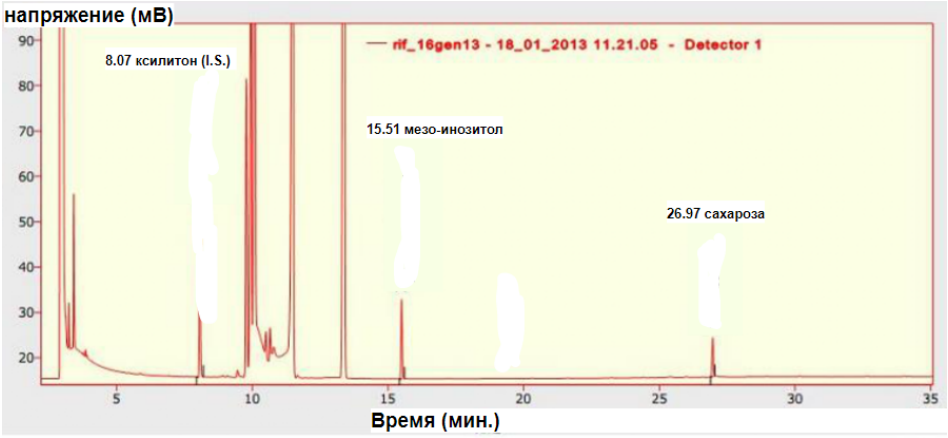


Рис. 9 Хроматограмма эталонного раствора для расчета коэффициентов отклика

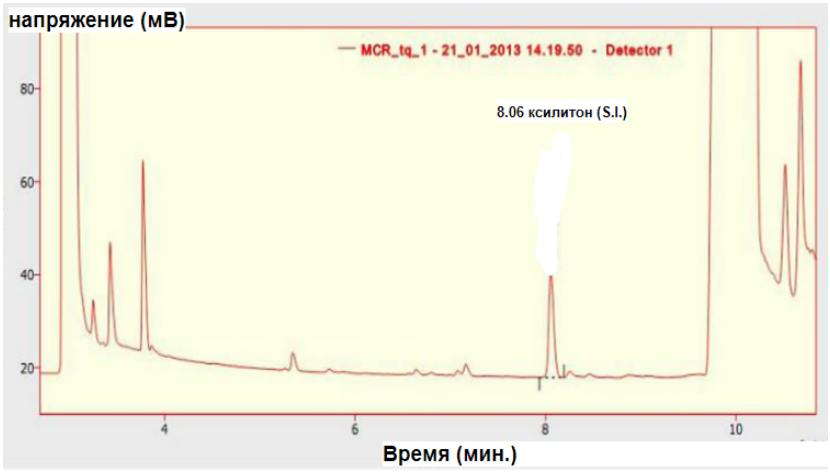


Рис. 10 Хроматограмма образца РКС - Зона внутреннего стандарта

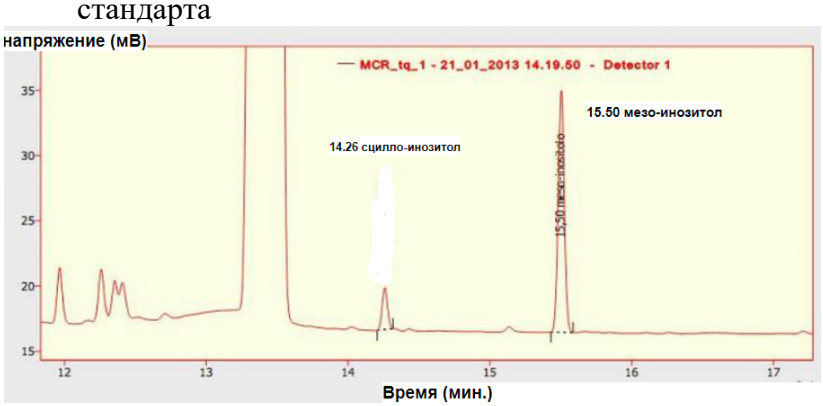


Рис. 11 Хроматограмма образца РКС - Зона Инозитола

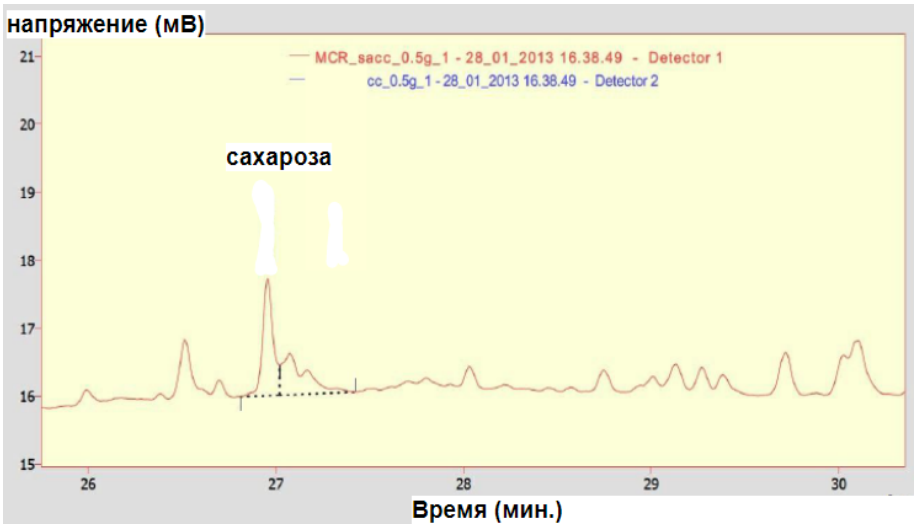


Рис. 12 Хроматограмма образца РКС - с добавлением 0,5 г/кг сахарозы

Метод OIV-MA-F1-13 Метод IV типа

Специфические методы анализа виноградного сахара

(Резолюция Oeno 419D/2015)

Индекс Фолина-Чокалтеу

1. ТЕРМИНОЛОГИЯ

Индекс Фолина-Чокалтеу (ИФК) - это результат, полученный в результате применения метода, описанного ниже.
Данный метод применяется к ректифицированным концентрированным суслам (РКС).

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Все фенольные соединения, содержащиеся в РКС, окисляются реактивом Фолина-Чокалтеу. В РКС могут вмешиваться другие восстанавливающие вещества, такие как, например, сахара и диоксид серы. Эти нтерференци можно оценить путем измерения «холостого» образца, лишенного фенольных веществ, приготовленного путем обработки соответствующего образца активированным углем.
Реактив Фолина-Чокалтеу образуется из смеси фосфорновольфрамовой кислоты $H_3PW_{12}O_{40}$ и фосфорномолибденовой кислоты $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$, которая после окисления восстанавливающих веществ, присутствующих в РКС, восстанавливается до смеси синих оксидов вольфрама (W_8O_{23}) и молибдена (Mo_8O_{23}). Полученное синее окрашивание имеет максимум поглощения в области 750 нм.

3. РЕАКТИВЫ

Они должны быть реагентами аналитического качества.

Используемая вода должна быть дистиллированной или водой эквивалентной чистоты.

3.1 Химикаты

3.1.1 Дигидрат вольфрамата натрия, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (CAS: 10213-10-2);

3.1.2 Дигидрат молибдата натрия, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (CAS: 10102-40-6);

3.1.3 Раствор фосфорной кислоты 85 масс. % в H_2O, H_3PO_4, ρ_{20} = 1,71 г/мл (CAS: 7664-38-2);

3.1.4 Соляная кислотаr, HCl, ρ_{20} = 1.2 г/мл (CAS: 7647-01-0);

3.1.5 Моногидрат сульфата лития $Li_2SO_4 \cdot 2H_2O$ (CAS: 10102-25-7);

3.1.6 Бром, Br_2 (CAS: 7726-95-6);

3.1.7 Карбонат натрия безводный Na_2CO_3, (CAS: 497-19-8);

3.1.8 Обесцвеченный активированный уголь (CAS:7440-44-0).

3.2. Реагент Ф-Ч

Данный реагент доступен на коммерческой основе в форме, готовой к использованию.
Его можно приготовить следующим образом: растворяют 100 г вольфрамата натрия ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) и 25 г молибдата натрия ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) в 700 мл дистиллированной воды. Добавляют 50 мл 85%-ной фосфорной кислоты (ρ_{20} = 1,71 г/мл) и 100 мл концентрированной соляной кислоты (ρ_{20} = 1,19 г/мл). Доводят до кипения и кипятят в течение 10 часов в условиях рефлюкса
Затем добавляют 150 г сульфата лития ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$) и несколько капель брома и кипятят еще раз в течение 15 минут. Остужают и доводят до одного литра дистиллированной водой.

3.3. Безводный карбонат натрия, Na_2CO_3, превращенный в 20 %-ный раствор.

4. АППАРАТУРА

Обычное лабораторное оборудование, в частности:

4.1. Волюметрические колбы объемом 100 мл.

4.2. Спектрофотометр, способный работать при длине волны 750 нм.

4.3. Технические весы (± 0,01 г)

4.4. Градуированная мензурка объемом 50 мл;

4.5. Мензурка объемом 50 мл;

4.6. Магнитная мешалка;

4.7. Фильтровальная бумага для быстрой фильтрации;

4.8. Калиброванная пипетка на 5 мл;

4.9. Кювета из оптического стекла;

4.10 Ультразвуковая ванна

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хорошая повторяемость результатов достигается за счет использования скрупулезно чистой аппаратуры (волюметрические колбы и кюветы спектрофотометра).

5.1. Подготовка анализируемого образца

Пусть P = процентное содержание (м/м) общего количества сахаров в ректифицированном концентрированном сусле.
Разбавляют РКС дистиллированной водой до общей концентрации сахара в растворе, равной 25 ± 0,5 % (м/м) (25° Вх): взвешивают массу в г, равную 2500/P, в волюметрической колбе (4.1) и доводят до 100 г водой.

5.2. Подготовка холостого образца

Отбирают 10 мл из раствора 5.1 с помощью градуированного цилиндра (4.4), помещают в 50 мл стакан (4.5) и добавляют 0,5 г активированного угля (3.1.8).
Оставляют на 15 минут в контакте с магнитной мешалкой (4.6), а затем фильтруют раствор с помощью бумаги для быстрой фильтрации (4.7).

5.3. Цветная реакция

5.3.1 Развитие цвета в образце

Вносят следующие реагенты или растворы в 100 мл волюметрическую колбу (4.1) строго в указанном ниже порядке:

- 5 мл образца (5.1) с помощью пипетки (4.8),
- 50 мл дистиллированной воды с помощью градуированного цилиндра (4.4),
- 5 мл реактива Фолина-Чокалтеу (3.2) с помощью пипетки (4.8),
- 20 мл раствора карбоната натрия (3.2) с помощью градуированного цилиндра (4.4).

Доводят до 100 мл дистиллированной водой. Перемешивают до гомогенизации. Ждут 30 минут, чтобы реакция стабилизировалась.

В этот период колбы следует поместить в ультразвуковую баню (4.10) на 15 минут для удаления любых пузырьков, которые могут помешать спектрофотометрическому измерению.

5.3.2 Развитие цвета в холостом образце

Действуют, как описано в (5.3.1), заменив образец (5.1) холостым образцом (5.2).

5.4. Измерение

Определяют поглощение при длине волны 750 нм через кювету из оптического стекла с длиной пути 1 см по отношению к холостому образцу (5.2).

Если абсорбция не составляет около 0,3, необходимо произвести соответствующее разбавление до тех пор, пока измеренная абсорбция не упадет до 0,3.

6. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1. Расчеты

Результат выражают в виде индекса, полученного путем умножения абсорбции на 16, с одной десятичной точкой.

Рассчитанное значение ИФК должно быть скорректировано на холостой образец по следующей формуле:
ИФК при 25° Bx = 16 *d* (A - A_{blank})

где:

A = поглощение при 750 нм, измеренное на образце при 25 ± 0,5 % (м/м)(5.1)

A_{blank} = поглощение при 750 нм, измеренное на холостом образце (5.2)

d = соответствующий коэффициент, если было произведено разбавление (5.4)

7. ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА

Метод был проверен в лаборатории ICQRF в Конельяно (Италия) при анализе двух образцов РКС. Каждый образец был дополнительно обогащен SO_2 в концентрации 5 мг/кг TS (мг на кг общего количества сахара). Образцы анализировались три раза:

Образцы	ИФК при 25°Bx			Среднее значение	SD	r=2.8xSD
РКС 1	5.4	4.9	5.3	5.2	0.3	0.8
РКС 2	2.2	2.4	1.9	2.2	0.2	0.7

Дополнительные данные были получены из лаборатории ASAE (Португалия):

Количество образцов	Диапазон концентраций	Sr	r	SR	R
21	От 1 до 5.3	0.25	0.7		
21	От 1 до 5.0			0.91	2.5