

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI¹⁾

z dnia 12 maja 2003 r.

**w sprawie metod analiz wyrobów winiarskich do celów urzędowej kontroli
pod względem jakości handlowej**

Na podstawie art. 29 pkt 2 ustawy z dnia 25 lipca 2001 r. o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich oraz obrocie tymi wyrobami (Dz. U. Nr 128, poz. 1401) zarządza się, co następuje:

§ 1. Analizę aromatyzowanych napojów winiarskich i wyrobów winiarskich gronowych pod względem jakości handlowej przeprowadza się, stosując nie mniej niż jedną z następujących metod do:

- 1) oznaczania gęstości i ciężaru właściwego w temperaturze 20 °C — określoną w załączniku nr 1 do rozporządzenia;
- 2) refraktometrycznego oznaczania zawartości cukrów w moszczach gronowych i zagęszczonych moszczach gronowych — określoną w załączniku nr 2 do rozporządzenia;

- 3) oznaczania zawartości alkoholu w procentach objętościowych — określoną w załączniku nr 3 do rozporządzenia;
- 4) oznaczania zawartości ekstraktu całkowitego (suchej masy ogółem) — określoną w załączniku nr 4 do rozporządzenia;
- 5) oznaczania zawartości cukrów redukujących — określoną w załączniku nr 5 do rozporządzenia;
- 6) oznaczania zawartości sacharozy — określoną w załączniku nr 6 do rozporządzenia;
- 7) oznaczania zawartości glukozy i fruktozy — określoną w załączniku nr 7 do rozporządzenia;
- 8) wykrywania wzbogacania moszczy gronowych, zagęszczonych moszczy gronowych i win metodą magnetycznego rezonansu jądrowego deuteru (SNIF-NMR/RMN-FINS) — określoną w załączniku nr 8 do rozporządzenia;
- 9) oznaczania zawartości popiołu — określoną w załączniku nr 9 do rozporządzenia;

¹⁾ Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rynki rolne, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 3 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 29 marca 2002 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 32, poz. 305).

- 10) oznaczania alkaliczności popiołu — określoną w załączniku nr 10 do rozporządzenia;
 - 11) oznaczania zawartości chlorków — określoną w załączniku nr 11 do rozporządzenia;
 - 12) oznaczania zawartości siarczanów — określoną w załączniku nr 12 do rozporządzenia;
 - 13) oznaczania kwasowości ogólnej — określoną w załączniku nr 13 do rozporządzenia;
 - 14) oznaczania kwasowości lotnej — określoną w załączniku nr 14 do rozporządzenia;
 - 15) oznaczania kwasowości związanej — określoną w załączniku nr 15 do rozporządzenia;
 - 16) oznaczania zawartości kwasu winowego — określoną w załączniku nr 16 do rozporządzenia;
 - 17) oznaczania zawartości kwasu cytrynowego — określoną w załączniku nr 17 do rozporządzenia;
 - 18) oznaczania zawartości kwasu mlekowego — określoną w załączniku nr 18 do rozporządzenia;
 - 19) oznaczania zawartości kwasu L-jabłkowego — określoną w załączniku nr 19 do rozporządzenia;
 - 20) oznaczania zawartości kwasu D-jabłkowego — określoną w załączniku nr 20 do rozporządzenia;
 - 21) oznaczania zawartości kwasu jabłkowego ogółem — określoną w załączniku nr 21 do rozporządzenia;
 - 22) oznaczania zawartości kwasu sorbowego — określoną w załączniku nr 22 do rozporządzenia;
 - 23) oznaczania zawartości kwasu L-askorbinowego — określoną w załączniku nr 23 do rozporządzenia;
 - 24) oznaczania wartości pH — określoną w załączniku nr 24 do rozporządzenia;
 - 25) oznaczania zawartości dwutlenku siarki — określoną w załączniku nr 25 do rozporządzenia;
 - 26) oznaczania zawartości sodu — określoną w załączniku nr 26 do rozporządzenia;
 - 27) oznaczania zawartości potasu — określoną w załączniku nr 27 do rozporządzenia;
 - 28) oznaczania zawartości magnezu — określoną w załączniku nr 28 do rozporządzenia;
 - 29) oznaczania zawartości wapnia — określoną w załączniku nr 29 do rozporządzenia;
 - 30) oznaczania zawartości żelaza — określoną w załączniku nr 30 do rozporządzenia;
 - 31) oznaczania zawartości miedzi — określoną w załączniku nr 31 do rozporządzenia;
 - 32) oznaczania zawartości kadmu — określoną w załączniku nr 32 do rozporządzenia;
 - 33) oznaczania zawartości srebra — określoną w załączniku nr 33 do rozporządzenia;
 - 34) oznaczania zawartości cynku — określoną w załączniku nr 34 do rozporządzenia;
 - 35) oznaczania zawartości ołowiu — określoną w załączniku nr 35 do rozporządzenia;
 - 36) oznaczania zawartości fluorków — określoną w załączniku nr 36 do rozporządzenia;
 - 37) oznaczania zawartości dwutlenku węgla — określoną w załączniku nr 37 do rozporządzenia;
 - 38) oznaczania zawartości pochodnych cyjankowych — określoną w załączniku nr 38 do rozporządzenia;
 - 39) wykrywania obecności izotiocyanianu allilowego — określoną w załączniku nr 39 do rozporządzenia;
 - 40) oznaczania wskaźnika Folin-Ciocalteu — określoną w załączniku nr 40 do rozporządzenia;
 - 41) oznaczania stosunku izotopów tlenu o masie atomowej 18 i 16 ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) w wodzie zawartej w winie — określoną w załączniku nr 41 do rozporządzenia.
- § 2. Analizę fermentowanych napojów winiarskich pod względem jakości handlowej przeprowadza się, stosując co najmniej jedną z następujących metod:
- 1) oznaczania gęstości i ciężaru właściwego w temperaturze 20 °C — określoną w załączniku nr 1 do rozporządzenia;
 - 2) oznaczania zawartości alkoholu w procentach objętościowych — określoną w załączniku nr 3 do rozporządzenia;
 - 3) oznaczania zawartości ekstraktu całkowitego (suchej masy ogółem) — określoną w załączniku nr 4 do rozporządzenia;
 - 4) oznaczania zawartości cukrów redukujących — określoną w załączniku nr 5 do rozporządzenia;
 - 5) oznaczania zawartości popiołu — określoną w załączniku nr 9 do rozporządzenia;
 - 6) oznaczania alkaliczności popiołu — określoną w załączniku nr 10 do rozporządzenia;
 - 7) oznaczania zawartości chlorków — określoną w załączniku nr 11 do rozporządzenia;
 - 8) oznaczania zawartości siarczanów — określoną w załączniku nr 12 do rozporządzenia;
 - 9) oznaczania kwasowości ogólnej — określoną w załączniku nr 13 do rozporządzenia;
 - 10) oznaczania kwasowości lotnej — określoną w załączniku nr 14 do rozporządzenia.
- § 3. Analizę wyrobów winiarskich pod względem jakości handlowej można przeprowadzać metodami innymi niż określone w rozporządzeniu, jeżeli stosowanie innych metod zapewnia porównywalną powtarzalność i odtwarzalność wyników, z tym że uznaje się za ostateczny wynik analizy przeprowadzonej metodą określoną w rozporządzeniu.
- § 4. Przepisy § 1 tracą moc z dniem uzyskania przez Rzeczpospolitą Polską członkostwa w Unii Europejskiej.
- § 5. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 14 dni od dnia ogłoszenia.

Załączniki do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 12 maja 2003 r. (poz. 1173)

Załącznik nr 1

OZNACZANIE GĘSTOŚCI I CIĘŻARU WŁAŚCIWEGO W TEMPERATURZE 20 °C

Gęstość jest stosunkiem masy określonej objętości wina lub moszczu w temperaturze 20 °C do tej objętości, wyrażanym w g/ml, oznaczanym symbolem ρ_{20} .

Ciężar właściwy w temperaturze 20 °C (lub gęstość względna) jest stosunkiem, wyrażonym liczbą dziesiętną, gęstości wina lub moszczu w temperaturze 20 °C do gęstości wody w tej samej temperaturze, oznaczanym symbolem d_{20}^{20} .

Gęstość i ciężar właściwy w temperaturze 20 °C w badanej próbce oznaczane są metodą piknometryczną.

1. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO ANALIZY

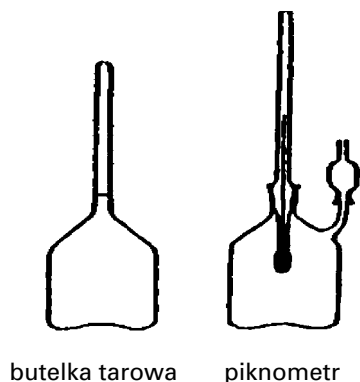
Jeśli próbka zawiera znaczne ilości dwutlenku węgla, usuwa się nadmiar tego dwutlenku węgla przez mieszanie 250 ml wina w litrowej kolbie lub przez wykonanie filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem.

2. APARATURA I SPRZĘT

Do oznaczenia gęstości i ciężaru właściwego w temperaturze 20 °C stosuje się typowy sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

- 1) piknometr przedstawiony na schemacie, wykonany ze szkła typu Pyrex, o pojemności około 100 ml, z wyjmowanym skalibrowanym termometrem, z doszlifowanym korkiem, o skali o działce elementarnej 1/10 stopnia w zakresie od 10 do 30 °C;
- 2) butelkę tarową przedstawioną na schemacie, o objętości takiej jak piknometr, z dopuszczalną tolerancją do 1 ml, o masie równej masie piknometru napełnionego cieczą o gęstości właściwej 1,01, np. 2,0 % m/v roztworem chlorku sodowego;
- 3) termicznie izolowaną osłonę (pojemnik) o kształcie dokładnie dopasowanym do kształtu piknometru;
- 4) wagę dwuszalkową o nośności nie mniejszej niż 300 g oraz czułości 0,1 mg albo wagę jednoszalkową o nośności nie mniejszej niż 200 g oraz czułości 0,1 mg.

Schemat piknometru i butelki tarowej



butelka tarowa

piknometr

Do analizy stosuje się piknometr, który posiada boczną rurkę o długości 25 mm o średnicy nieprzekraczającej 1 mm, zakończoną stożkowym szlifem lub zamkniętą korkiem zbiornikowym, który składa się z rurki ze stożkowym szlifem, wydłużonej części na końcu i komory w środkowej części.

3. KALIBRACJA PIKNOMETRU

Kalibracja piknometru polega na oznaczeniu:

- 1) tary pustego piknometru;
- 2) objętości piknometru w temperaturze 20 °C;
- 3) masy piknometru po napełnieniu go wodą o temperaturze 20 °C.

Metoda oznaczania gęstości i ciężaru właściwego w temperaturze 20 °C z zastosowaniem wagi dwuszalkowej

Butelkę tarową stawia się na lewej szalce wagi, natomiast czysty i suchy piknometr, zamknięty „korkiem zbiornikowym”, stawia się na prawej szalce wagi. Na szalce z piknometrem umieszcza się odważniki w liczbie potrzebnej do uzyskania równowagi. Następnie zapisuje się łączną masę odważników w gramach, oznaczaną dalej literą „ ρ ”.

Piknometr napełnia się wodą destylowaną o temperaturze pokojowej, wkłada się do niego termometr. Ostrożnie wyciera się piknometr, a następnie umieszcza go w termicznie izolowanym pojemniku. Pojownik z piknometrem odwraca się parokrotnie w celu wyrównania temperatury. Po osiągnięciu wyrównanej stałej temperatury uzupełnia się poziom wody w piknometrze do poziomu górnej krawędzi bocznej rurki. Wyciera się do sucha ścianki rurki, wkłada „korek zbiornikowy” i dokładnie odczytuje wskazanie temperatury t °C.

Napełniony wodą piknometr umieszcza się na prawej szalce wagi, a butelkę tarową na lewej. Na szalkę z piknometrem napełnionym wodą dokłada się odważniki w liczbie potrzebnej do uzyskania równowagi, następnie zapisuje się ich łączną masę ρ' w gramach.

Obliczanie wyniku oznaczania:

- 1) tara pustego piknometru = $\rho + m$,
gdzie m oznacza masę powietrza wypełniającego piknometr, $m = 0,0012 (\rho - \rho')$;
- 2) objętość piknometru (V_{20}) w temperaturze 20 °C ustala się z dokładnością $\pm 0,001$ ml według wzoru:

$$V_{20} = (\rho + m - \rho') \times F,$$

gdzie F jest współczynnikiem odczytanym z tabeli nr I załącznika, dla temperatury t °C;

3) masa wody (M_{20}) w temperaturze 20 °C:

$$M_{20} = 0,998203 V_{20},$$

gdzie liczba 0,998203 jest gęstością wody w temperaturze 20 °C.

Metoda oznaczania gęstości i ciężaru właściwego w temperaturze 20 °C z zastosowaniem wagi jednoszalkowej

W metodzie z zastosowaniem wagi jednoszalkowej oznacza się:

- 1) tarę pustego piknometr, oznaczaną symbolem P;
- 2) masę piknometr napelnionego wodą o temperaturze t °C, oznaczaną symbolem P₁;
- 3) masę butelki tarowej, oznaczaną symbolem T₀.

Obliczanie wyniku oznaczania:

- 1) tara pustego piknometr = P — m, gdzie m oznacza masę powietrza wypełniającego piknometr, $m = 0,0012 (P_1 - P)$;
- 2) objętość piknometr (V_{20}) w temperaturze 20 °C oblicza się według wzoru:

$$V_{20} = [P - (P - m)] \times F,$$

gdzie F = współczynnik odczytany z tabeli nr I załącznika dla temperatury t °C.

Objętość piknometr podaje się z dokładnością do ±0,001 ml;

- 3) masę wody (M_{20}) w temperaturze 20 °C oblicza się według wzoru:

$$M_{20} = 0,998203 V_{20},$$

gdzie 0,998203 jest gęstością wody w temperaturze 20 °C.

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Metoda z wykorzystaniem wagi dwuszalkowej

Piknometr napelnia się przygotowaną próbką i przeprowadza postępowanie analogicznie jak w przypadku napelnienia wodą destylowaną.

Obliczanie wyniku oznaczenia:

- 1) masa próbki zawartej w piknometrze = $\rho + m - \rho''$, gdzie ρ'' oznacza masę odważników w gramach potrzebną do uzyskania równowagi podczas ważenia pomiędzy butelką tarową znajdującą się na lewej szalce i piknometrem napelnionym badaną próbką znajdującym się na prawej szalce wagi;
- 2) pozorną gęstość (ρ_t) w temperaturze t °C oblicza się według wzoru:

$$\rho_t = \frac{\rho + m - \rho''}{V_{20}};$$

- 3) gęstość w temperaturze 20 °C oblicza się, wykorzystując jedną z tabel poprawek zamieszczonych

w dalszej części dokumentu, zgodnie z rodzajem badanej cieczy: wino o zawartości cukrów mniejszej niż 33 g/l (tabela nr II), naturalny lub zagęszczony moszcz (tabela nr III), wino o zawartości cukrów powyżej 33 g/l (tabela nr IV);

- 4) ciężar właściwy d_{20}^{20} badanego wina oblicza się przez podzielenie jego gęstości w temperaturze 20 °C przez gęstość wody w temperaturze 20 °C, która wynosi 0,998203.

Metoda z wykorzystaniem wagi jednoszalkowej

W metodzie z wykorzystaniem wagi jednoszalkowej oznacza się:

- 1) tarę pustego piknometr, oznaczaną symbolem P;
- 2) masę piknometr napelnionego badaną próbką o temperaturze t °C, oznaczaną symbolem P₂;
- 3) masę butelki tarowej oznaczanej symbolem T_t.

Obliczanie wyniku oznaczania

- 1) masa pustego piknometr w czasie pomiaru = P — m + dT, gdzie $dT = T_t - T_0$;
- 2) masa próbki zawartej w piknometrze w temperaturze t °C = $P_2 - (P - m + dT)$;
- 3) gęstość pozorną (ρ_t) w temperaturze t °C oblicza się według wzoru:

$$\rho_t = \frac{P_2 - (P - m + dT)}{V_{20}};$$

- 4) gęstość w temperaturze 20 °C oblicza się, wykorzystując jedną z tabel poprawek zamieszczonych w dalszej części dokumentu, zgodnie z rodzajem badanej cieczy: wino o zawartości cukrów poniżej 33 g/l i wino pozbawione alkoholu (tabela nr II), naturalny lub zagęszczony moszcz (tabela nr III), wino o zawartości cukrów powyżej 33 g/l (tabela nr IV);
- 5) ciężar właściwy d_{20}^{20} wina jest obliczany przez podzielenie jego gęstości w temperaturze 20 °C przez gęstość wody w temperaturze 20 °C równą 0,998203.

Dla uzyskania bardzo dokładnych oznaczeń wynik pomiaru gęstości koryguje się, uwzględniając wpływ dwutlenku siarki, zgodnie z wzorem:

$$\rho_{20} = \rho'_{20} - 0,0006 \times S,$$

gdzie ρ_{20} — oznacza gęstość skorygowaną,

ρ'_{20} — oznacza gęstość zmierzoną,

S — oznacza całkowitą zawartość dwutlenku siarki w g/l.

5. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania gęstości i ciężaru właściwego w temperaturze 20 °C powtarzalność (r) wynosi:

- 1) dla win o zawartości cukrów niższej od 33 g/l:
 $r = 0,00010$;
- 2) dla win o zawartości cukrów powyżej 33 g/l:
 $r = 0,00018$.

6. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna

różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania gęstości i ciężaru właściwego w temperaturze 20 °C odtwarzalność (R) wynosi:

- 1) dla win o zawartości cukrów niższej od 33 g/l:
 $R = 0,00037$;
- 2) dla win o zawartości cukrów powyżej 33 g/l:
 $R = 0,00045$.

TABELA nr I

Wartości współczynnika F do obliczenia objętości piknometru w temperaturze 20 °C

| t °C | F | t °C | F | t °C | F | t °C | F | t °C | F | t °C | F | t °C | 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 | 1,003787 |
| ,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 | ,7 | 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 | 1,001290 | ,2 | 1,001859 | ,2 | 1,002485 | ,2 | 1,003222 | ,2 | 1,004042 |
| ,3 | 1,000511 | ,3 | 1,000855 | ,3 | 1,001306 | ,3 | 1,001839 | ,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 | ,7 | 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 | 1,003458 | | |
| ,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 | | |

Objaśnienie:

Podane w tabeli wartości współczynnika F pomnożone przez masę wody o temperaturze t °C zawartej w piknometrze ze szkła typu Pyrex stosuje się do obliczenia objętości piknometru w temperaturze 20 °C.

TABELA nr IV

Wartości współczynnika korekcji temperatury „C” mające zastosowanie do obliczania gęstości win o stężeniu alkoholu nie mniejszym niż 13 % obj., zawierających pozostałości cukrów, mierzonej przy użyciu piknometru ze szkła typu Pyrex w temperaturze t °C w celu wyrażenia wyniku w temperaturze 20 °C

| Temp. (°C) | Wina o stężeniu alkoholu 13 % obj. | | | | | | | Wina o stężeniu alkoholu 15 % obj. | | | | | | | Wina o stężeniu alkoholu 17 % obj. | | | | | | |
|------------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Gęstość | | | | | | | Gęstość | | | | | | | Gęstość | | | | | | |
| | 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 |
| 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° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21° | 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 | 4,00 | 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 |

| Temp. (°C) | Wina o stężeniu alkoholu 19 % obj. | | | | | | | Wina o stężeniu alkoholu 21 % obj. | | | | | | |
|------------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Gęstość | | | | | | | Gęstość | | | | | | |
| | 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 |
| 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° | 2,40 | 2,64 | 2,87 | 3,09 | 3,30 | 3,51 | 3,71 | 2,64 | 2,88 | 3,11 | 3,33 | 3,54 | 3,74 | 3,95 |
| 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 |

Objaśnienie:

Podane w tabeli wartości współczynnika korekcji temperatury „C” stosuje się do obliczania gęstości win o stężeniu alkoholu nie mniejszym niż 13 % obj., zawierających pozostałości cukrów, mierzonej przy użyciu piknometru ze szkła typu Pyrex w temperaturze t °C w celu sprowadzenia wyniku do temperatury 20 °C, według następującego wzoru:

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

— jeżeli temperatura t °C jest niższa od 20 °C
+ jeżeli temperatura t °C jest wyższa od 20 °C

Załącznik nr 2

REFRAKTOMETRYCZNE OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CUKRÓW W MOSZCZACH GRONOWYCH
I ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZACH GRONOWYCH

Oznaczanie zawartości cukrów w moszczach gronowych, zagęszczonych moszczach gronowych polega na obliczeniu ich zawartości w g/l lub w g/kg na podstawie:

- 1) współczynnika refrakcji wyrażonego w wartościach bezwzględnych i zawartego w tabelach lub
- 2) zawartości sacharozy wyrażonej w % wagowych.

1. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII

Przygotowanie moszczu lub moszczu zagęszczonego wykonuje się, przesączając go przez suchą gazę złożoną czterokrotnie, przy czym pierwsze krople przesączu odrzuca się.

2. APARATURA I SPRZĘT

Refraktometr Abbego ze skalą podającą:

- 1) % wagowe sacharozy z dokładnością do 0,1 % lub
- 2) współczynnik refrakcji do czwartego miejsca po przecinku.

Do oznaczania zawartości cukrów stosuje się refraktometr wyposażony w termometr ze skalą o zakresie co najmniej od +15 °C do +25 °C oraz w urządzenie do cyrkulacji wody umożliwiające dokonywanie pomiarów w temperaturze 20±5 °C.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Próbkę doprowadza się do temperatury bliskiej 20 °C. Następnie niewielką ilość tej próbki umieszcza się na dolnym przyzmacie refraktometru tak, aby próbka równomiernie pokrywała szklaną powierzchnię. Zawartość sacharozy odczytuje się w % wagowych

z dokładnością do 0,1 %, a współczynnik refrakcji z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku.

Dodatkowo ustala się wartość temperatury t °C.

Oznaczanie wykonuje się w dwóch powtórzeniach.

4. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Poprawka uwzględniająca wpływ temperatury jest stosowana w przypadku użycia refraktometru wyskalowanego w % wagowych sacharozy. Do odczytania wartości poprawki korzysta się z tabeli nr I załącznika.

W przypadku zastosowania refraktometru wyskalowanego w wartościach współczynnika refrakcji do odczytania odpowiedniej wartości zawartości sacharozy w % wagowych w temperaturze t °C w tabeli nr II załącznika odczytuje się zawartość sacharozy odpowiadającą zmierzonej wartości współczynnika refrakcji. Ustalaną w ten sposób zawartość sacharozy koryguje się za pomocą danych podanych w tabeli nr I załącznika.

Zawartość sacharozy w moszczach i moszczach zagęszczonych w % wagowych w temperaturze 20 °C odnajduje się w tabeli nr II załącznika i odczytuje odpowiednią zawartość sacharozy w g/l i g/kg. Zawartość cukrów jest wyrażana w przeliczeniu na cukier inwertowany z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

Przy ustalaniu współczynnika refrakcji moszczu lub moszczu zagęszczonego zawartość sacharozy w temperaturze 20 °C odnajduje się w tabeli nr II i odczytuje odpowiednią wartość współczynnika refrakcji w temperaturze 20 °C. Współczynnik ten podany jest z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku.

TABELA nr I

Wartości poprawek mające zastosowanie, gdy oznaczenie zawartości sacharozy w procentach masowych zostało wykonane w temperaturze różnej od 20 °C

| Temp. (°C) | Zawartość sacharozy w gramach na 100 gramów produktu | | | | | | | | | |
|------------|------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 75 |
| | odjąć następujące poprawki od zawartości sacharozy | | | | | | | | | |
| 15° | 0,25 | 0,27 | 0,31 | 0,31 | 0,34 | 0,35 | 0,36 | 0,37 | 0,36 | 0,36 |
| 16° | 0,21 | 0,23 | 0,27 | 0,27 | 0,29 | 0,31 | 0,31 | 0,32 | 0,31 | 0,23 |
| 17° | 0,16 | 0,18 | 0,20 | 0,20 | 0,22 | 0,23 | 0,23 | 0,23 | 0,20 | 0,17 |
| 18° | 0,11 | 0,12 | 0,14 | 0,15 | 0,16 | 0,16 | 0,15 | 0,12 | 0,12 | 0,09 |
| 19° | 0,06 | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,07 | 0,05 |
| | dodać następujące poprawki do zawartości sacharozy | | | | | | | | | |
| 21° | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 |
| 22° | 0,12 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 |
| 23° | 0,18 | 0,20 | 0,20 | 0,21 | 0,21 | 0,21 | 0,21 | 0,22 | 0,22 | 0,22 |
| 24° | 0,24 | 0,26 | 0,26 | 0,27 | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,29 | 0,39 |
| 25° | 0,30 | 0,32 | 0,32 | 0,34 | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,37 |

Objaśnienie:

Podane w tabeli poprawki mają zastosowanie w przypadku dokonania oznaczenia zawartości sacharozy w procentach masowych przy temperaturze różnej od 20 °C.

TABELA nr II

Zawartość cukrów w moszczu gronowym i zagęszczonym moszczu gronowym w g/l i g/kg, oznaczona za pomocą refraktometru wyskalowanego w % wag. sacharozy w temperaturze 20 °C lub w wartości współczynnika refrakcji w temperaturze 20 °C, przeliczona na cukier inwertowany

| Sacharoza % wagowo | Współczynnik refrakcji w temp. 20 °C | Gęstość w temp. 20 °C | Cukry w g/l | Cukry w g/kg | Zawartość alkoholu % obj. w 20 °C |
|-----------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-------------|--------------|--------------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 10,0 | 1,34781 | 1,0390 | 82,3 | 79,3 | 4,89 |
| 10,1 | 1,34798 | 1,0394 | 83,4 | 80,2 | 4,95 |
| 10,2 | 1,34814 | 1,0398 | 84,5 | 81,3 | 5,02 |
| 10,3 | 1,34830 | 1,0402 | 85,6 | 82,2 | 5,09 |
| 10,4 | 1,34845 | 1,0406 | 86,6 | 83,2 | 5,14 |
| 10,5 | 1,34860 | 1,0410 | 87,6 | 84,1 | 5,20 |
| 10,6 | 1,34875 | 1,0414 | 88,6 | 85,1 | 5,26 |
| 10,7 | 1,34890 | 1,0419 | 89,7 | 86,1 | 5,33 |
| 10,8 | 1,34906 | 1,0423 | 90,8 | 87,1 | 5,39 |
| 10,9 | 1,34921 | 1,0427 | 91,8 | 88,1 | 5,45 |
| 11,0 | 1,34936 | 1,0431 | 92,9 | 89,1 | 5,52 |
| 11,1 | 1,34952 | 1,0435 | 94,0 | 90,0 | 5,58 |
| 11,2 | 1,34968 | 1,0439 | 95,6 | 91,0 | 5,64 |
| 11,3 | 1,34984 | 1,0443 | 96,1 | 92,0 | 5,71 |
| 11,4 | 1,34999 | 1,0447 | 97,1 | 92,9 | 5,77 |
| 11,5 | 1,35015 | 1,0452 | 98,2 | 94,0 | 5,83 |
| 11,6 | 1,35031 | 1,0456 | 99,3 | 95,0 | 5,90 |
| 11,7 | 1,35046 | 1,0460 | 100,3 | 95,9 | 5,96 |
| 11,8 | 1,35062 | 1,0464 | 101,4 | 96,9 | 6,02 |
| 11,9 | 1,35077 | 1,0468 | 102,5 | 97,9 | 6,09 |
| 12,0 | 1,35092 | 1,0473 | 103,6 | 98,9 | 6,15 |
| 12,1 | 1,35108 | 1,0477 | 104,7 | 99,9 | 6,22 |
| 12,2 | 1,35124 | 1,0481 | 105,7 | 100,8 | 6,28 |
| 12,3 | 1,35140 | 1,0485 | 106,8 | 101,9 | 6,35 |
| 12,4 | 1,35156 | 1,0489 | 107,9 | 102,9 | 6,41 |
| 12,5 | 1,35172 | 1,0494 | 109,0 | 103,8 | 6,47 |
| 12,6 | 1,35187 | 1,0498 | 110,0 | 104,8 | 6,53 |
| 12,7 | 1,35203 | 1,0502 | 111,1 | 105,8 | 6,60 |
| 12,8 | 1,35219 | 1,0506 | 112,2 | 106,8 | 6,66 |
| 12,9 | 1,35234 | 1,0510 | 113,2 | 107,8 | 6,73 |
| 13,0 | 1,35249 | 1,0514 | 114,3 | 108,7 | 6,79 |
| 13,1 | 1,35266 | 1,0519 | 115,4 | 109,7 | 6,86 |
| 13,2 | 1,35282 | 1,0523 | 116,5 | 110,7 | 6,92 |
| 13,3 | 1,35298 | 1,0527 | 117,6 | 111,7 | 6,99 |
| 13,4 | 1,35313 | 1,0531 | 118,6 | 112,6 | 7,05 |
| 13,5 | 1,35329 | 1,0536 | 119,7 | 113,6 | 7,11 |
| 13,6 | 1,35345 | 1,0540 | 120,8 | 114,6 | 7,18 |
| 13,7 | 1,35360 | 1,0544 | 121,8 | 115,6 | 7,24 |
| 13,8 | 1,35376 | 1,0548 | 122,9 | 116,5 | 7,30 |
| 13,9 | 1,35391 | 1,0552 | 124,0 | 117,5 | 7,37 |
| 14,0 | 1,35407 | 1,0557 | 125,1 | 118,5 | 7,43 |
| 14,1 | 1,35424 | 1,0561 | 126,2 | 119,5 | 7,50 |
| 14,2 | 1,35440 | 1,0565 | 127,3 | 120,5 | 7,56 |
| 14,3 | 1,35456 | 1,0569 | 128,4 | 121,5 | 7,63 |
| 14,4 | 1,35472 | 1,0574 | 129,5 | 122,5 | 7,69 |
| 14,5 | 1,35488 | 1,0578 | 130,6 | 123,4 | 7,76 |
| 14,6 | 1,35503 | 1,0582 | 131,6 | 124,4 | 7,82 |
| 14,7 | 1,35519 | 1,0586 | 132,7 | 125,4 | 7,88 |
| 14,8 | 1,35535 | 1,0591 | 133,8 | 126,3 | 7,95 |
| 14,9 | 1,35551 | 1,0595 | 134,9 | 127,3 | 8,01 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 15,0 | 1,35567 | 1,0599 | 136,0 | 128,3 | 8,08 |
| 15,1 | 1,35583 | 1,0603 | 137,1 | 129,3 | 8,15 |
| 15,2 | 1,35599 | 1,0608 | 138,2 | 130,3 | 8,21 |
| 15,3 | 1,35615 | 1,0612 | 139,3 | 131,3 | 8,27 |
| 15,4 | 1,35631 | 1,0616 | 140,4 | 132,3 | 8,34 |
| 15,5 | 1,35648 | 1,0621 | 141,5 | 133,2 | 8,41 |
| 15,6 | 1,35664 | 1,0625 | 142,6 | 134,2 | 8,47 |
| 15,7 | 1,35680 | 1,0629 | 143,7 | 135,2 | 8,54 |
| 15,8 | 1,35696 | 1,0633 | 144,8 | 136,2 | 8,60 |
| 15,9 | 1,35712 | 1,0638 | 145,9 | 137,2 | 8,67 |
| 16,0 | 1,35728 | 1,0642 | 147,0 | 138,1 | 8,73 |
| 16,1 | 1,35744 | 1,0646 | 148,1 | 139,1 | 8,80 |
| 16,2 | 1,35760 | 1,0651 | 149,2 | 140,1 | 8,86 |
| 16,3 | 1,35776 | 1,0655 | 150,3 | 141,1 | 8,93 |
| 16,4 | 1,35793 | 1,0660 | 151,5 | 142,1 | 9,00 |
| 16,5 | 1,35809 | 1,0664 | 152,6 | 143,1 | 9,06 |
| 16,6 | 1,35825 | 1,0668 | 153,7 | 144,1 | 9,13 |
| 16,7 | 1,35842 | 1,0672 | 154,8 | 145,0 | 9,20 |
| 16,8 | 1,35858 | 1,0677 | 155,9 | 146,0 | 9,26 |
| 16,9 | 1,35874 | 1,0681 | 157,0 | 147,0 | 9,33 |
| 17,0 | 1,35890 | 1,0685 | 158,1 | 148,0 | 9,39 |
| 17,1 | 1,35907 | 1,0690 | 159,3 | 149,0 | 9,46 |
| 17,2 | 1,35923 | 1,0694 | 160,4 | 150,0 | 9,53 |
| 17,3 | 1,35939 | 1,0699 | 161,5 | 151,0 | 9,59 |
| 17,4 | 1,35955 | 1,0703 | 162,6 | 151,9 | 9,66 |
| 17,5 | 1,35972 | 1,0707 | 163,7 | 152,9 | 9,73 |
| 17,6 | 1,35988 | 1,0711 | 164,8 | 153,9 | 9,79 |
| 17,7 | 1,36004 | 1,0716 | 165,9 | 154,8 | 9,86 |
| 17,8 | 1,36020 | 1,0720 | 167,0 | 155,8 | 9,92 |
| 17,9 | 1,36036 | 1,0724 | 168,1 | 156,8 | 9,99 |
| 18,0 | 1,36053 | 1,0729 | 169,3 | 157,8 | 10,06 |
| 18,1 | 1,36070 | 1,0733 | 170,4 | 158,8 | 10,12 |
| 18,2 | 1,36086 | 1,0738 | 171,5 | 159,7 | 10,19 |
| 18,3 | 1,36102 | 1,0742 | 172,6 | 160,7 | 10,25 |
| 18,4 | 1,36119 | 1,0746 | 173,7 | 161,6 | 10,32 |
| 18,5 | 1,36136 | 1,0751 | 174,9 | 162,6 | 10,39 |
| 18,6 | 1,36152 | 1,0755 | 176,0 | 163,6 | 10,46 |
| 18,7 | 1,36169 | 1,0760 | 177,2 | 164,6 | 10,53 |
| 18,8 | 1,36185 | 1,0764 | 178,3 | 165,6 | 10,59 |
| 18,9 | 1,36201 | 1,0768 | 179,4 | 166,6 | 10,66 |
| 19,0 | 1,36217 | 1,0773 | 180,5 | 167,6 | 10,72 |
| 19,1 | 1,36234 | 1,0777 | 181,7 | 168,6 | 10,80 |
| 19,2 | 1,36251 | 1,0782 | 182,8 | 169,5 | 10,86 |
| 19,3 | 1,36267 | 1,0786 | 183,9 | 170,5 | 10,93 |
| 19,4 | 1,36284 | 1,0791 | 185,1 | 171,5 | 11,00 |
| 19,5 | 1,36301 | 1,0795 | 186,3 | 172,5 | 11,07 |
| 19,6 | 1,36318 | 1,0600 | 187,4 | 173,5 | 11,13 |
| 19,7 | 1,36335 | 1,0804 | 188,6 | 174,5 | 11,21 |
| 19,8 | 1,36351 | 1,0809 | 189,7 | 175,5 | 11,27 |
| 19,9 | 1,36367 | 1,0813 | 190,8 | 176,5 | 11,34 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 20,0 | 1,36383 | 1,0817 | 191,9 | 177,4 | 11,40 |
| 20,1 | 1,36400 | 1,0822 | 193,1 | 178,4 | 11,47 |
| 20,2 | 1,36417 | 1,0826 | 194,2 | 179,4 | 11,54 |
| 20,3 | 1,36434 | 1,0831 | 195,3 | 180,4 | 11,60 |
| 20,4 | 1,36451 | 1,0835 | 196,5 | 181,4 | 11,67 |
| 20,5 | 1,36468 | 1,0840 | 197,7 | 182,3 | 11,75 |
| 20,6 | 1,36484 | 1,0844 | 196,8 | 183,3 | 11,81 |
| 20,7 | 1,36501 | 1,0649 | 200,0 | 184,3 | 11,88 |
| 20,8 | 1,36518 | 1,0853 | 201,1 | 185,3 | 11,96 |
| 20,9 | 1,36534 | 1,0857 | 202,2 | 186,2 | 12,01 |
| 21,0 | 1,36550 | 1,0862 | 203,3 | 187,2 | 12,08 |
| 21,1 | 1,36568 | 1,0866 | 204,5 | 188,2 | 12,15 |
| 21,2 | 1,36585 | 1,0871 | 205,7 | 189,2 | 12,22 |
| 21,3 | 1,36601 | 1,0875 | 206,8 | 190,2 | 12,29 |
| 21,4 | 1,36618 | 1,0880 | 207,9 | 191,1 | 12,35 |
| 21,5 | 1,36635 | 1,0884 | 209,1 | 192,1 | 12,42 |
| 21,6 | 1,36652 | 1,0889 | 210,3 | 193,1 | 12,49 |
| 21,7 | 1,36669 | 1,0893 | 211,4 | 194,1 | 12,56 |
| 21,8 | 1,16685 | 1,0897 | 212,5 | 195,0 | 12,63 |
| 21,9 | 1,36702 | 1,0902 | 213,6 | 196,0 | 12,69 |
| 22,0 | 1,36719 | 1,0906 | 214,8 | 196,9 | 12,76 |
| 22,1 | 1,36736 | 1,0911 | 216,0 | 198,0 | 12,83 |
| 22,2 | 1,36753 | 1,0916 | 217,2 | 199,0 | 12,90 |
| 22,3 | 1,36770 | 1,0920 | 218,3 | 199,9 | 12,97 |
| 22,4 | 1,36787 | 1,0925 | 219,5 | 200,9 | 13,04 |
| 22,5 | 1,36804 | 1,0929 | 220,6 | 201,8 | 13,11 |
| 22,6 | 1,36820 | 1,0933 | 221,7 | 202,8 | 13,17 |
| 22,7 | 1,36837 | 1,0938 | 222,9 | 203,8 | 13,24 |
| 22,8 | 1,36854 | 1,0943 | 224,1 | 204,8 | 13,31 |
| 22,9 | 1,36871 | 1,0947 | 225,2 | 205,8 | 13,38 |
| 23,0 | 1,36888 | 1,0952 | 226,4 | 206,7 | 13,45 |
| 23,1 | 1,36905 | 1,0956 | 227,6 | 207,7 | 13,52 |
| 23,2 | 1,36922 | 1,0961 | 228,7 | 208,7 | 13,59 |
| 23,3 | 1,36939 | 1,0965 | 229,9 | 209,7 | 13,66 |
| 23,4 | 1,36956 | 1,0970 | 231,1 | 210,7 | 13,73 |
| 23,5 | 1,36973 | 1,0975 | 232,3 | 211,6 | 13,80 |
| 23,6 | 1,36991 | 1,0979 | 233,4 | 212,6 | 13,87 |
| 23,7 | 1,37008 | 1,0984 | 234,6 | 213,6 | 13,94 |
| 23,8 | 1,37025 | 1,0988 | 235,8 | 214,6 | 14,01 |
| 23,9 | 1,37042 | 1,0993 | 237,0 | 215,6 | 14,08 |
| 24,0 | 1,37059 | 1,0998 | 238,2 | 216,6 | 14,15 |
| 24,1 | 1,37076 | 1,1007 | 239,3 | 217,4 | 14,22 |
| 24,2 | 1,37093 | 1,1011 | 240,3 | 218,2 | 14,28 |
| 24,3 | 1,37110 | 1,1016 | 241,6 | 219,4 | 14,35 |
| 24,4 | 1,37128 | 1,1022 | 243,0 | 220,5 | 14,44 |
| 24,5 | 1,37145 | 1,1026 | 244,0 | 221,3 | 14,50 |
| 24,6 | 1,37162 | 1,1030 | 245,0 | 222,1 | 14,56 |
| 24,7 | 1,37180 | 1,1035 | 246,4 | 223,2 | 14,64 |
| 24,8 | 1,37197 | 1,1041 | 247,7 | 224,4 | 14,72 |
| 24,9 | 1,37214 | 1,1045 | 248,7 | 225,2 | 14,78 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 25,0 | 1,37232 | 1,1049 | 249,7 | 226,0 | 14,84 |
| 25,1 | 1,37249 | 1,1053 | 250,7 | 226,8 | 14,90 |
| 25,2 | 1,37266 | 1,1057 | 251,7 | 227,6 | 14,96 |
| 25,3 | 1,37283 | 1,1062 | 253,0 | 228,7 | 15,03 |
| 25,4 | 1,37300 | 1,1068 | 254,4 | 229,9 | 15,11 |
| 25,5 | 1,37317 | 1,1072 | 255,4 | 230,7 | 15,17 |
| 25,6 | 1,37335 | 1,1076 | 256,4 | 231,5 | 15,23 |
| 25,7 | 1,37353 | 1,1081 | 257,8 | 232,6 | 15,32 |
| 25,8 | 1,37370 | 1,1087 | 259,1 | 233,7 | 15,39 |
| 25,9 | 1,37387 | 1,1091 | 260,1 | 234,5 | 15,45 |
| 26,0 | 1,37405 | 1,1095 | 261,1 | 235,3 | 15,51 |
| 26,1 | 1,37423 | 1,1100 | 262,5 | 236,4 | 15,60 |
| 26,2 | 1,37440 | 1,1106 | 263,8 | 237,5 | 15,67 |
| 26,3 | 1,37457 | 1,1110 | 264,8 | 238,3 | 15,73 |
| 26,4 | 1,37475 | 1,1114 | 265,8 | 239,2 | 15,79 |
| 26,5 | 1,37493 | 1,1119 | 267,2 | 240,3 | 15,88 |
| 26,6 | 1,37510 | 1,1125 | 268,5 | 241,4 | 15,95 |
| 26,7 | 1,37528 | 1,1129 | 269,5 | 242,2 | 16,01 |
| 26,8 | 1,37545 | 1,1133 | 270,5 | 243,0 | 16,07 |
| 26,9 | 1,37562 | 1,1138 | 271,8 | 244,1 | 16,15 |
| 27,0 | 1,37580 | 1,1144 | 273,2 | 245,2 | 16,23 |
| 27,1 | 1,37598 | 1,1148 | 274,2 | 246,0 | 16,29 |
| 27,2 | 1,37615 | 1,1152 | 275,2 | 246,8 | 16,35 |
| 27,3 | 1,37632 | 1,1157 | 276,5 | 247,9 | 16,43 |
| 27,4 | 1,37650 | 1,1163 | 277,9 | 249,0 | 16,51 |
| 27,5 | 1,37667 | 1,1167 | 278,9 | 249,8 | 16,57 |
| 27,6 | 1,37685 | 1,1171 | 279,9 | 250,6 | 16,63 |
| 27,7 | 1,37703 | 1,1176 | 281,3 | 251,6 | 16,71 |
| 27,8 | 1,37721 | 1,1182 | 282,6 | 252,7 | 16,79 |
| 27,9 | 1,37739 | 1,1186 | 283,6 | 253,5 | 16,85 |
| 28,0 | 1,37757 | 1,1190 | 284,6 | 254,3 | 16,91 |
| 28,1 | 1,37775 | 1,1195 | 286,0 | 255,4 | 16,99 |
| 28,2 | 1,37793 | 1,1201 | 287,3 | 256,5 | 17,07 |
| 28,3 | 1,37810 | 1,1205 | 288,3 | 257,3 | 17,13 |
| 28,4 | 1,37828 | 1,1209 | 289,3 | 258,1 | 17,19 |
| 28,5 | 1,37846 | 1,1214 | 290,7 | 259,2 | 17,27 |
| 28,6 | 1,37863 | 1,1220 | 292,0 | 260,3 | 17,35 |
| 28,7 | 1,37881 | 1,1224 | 293,0 | 261,0 | 17,41 |
| 28,8 | 1,37899 | 1,1228 | 294,0 | 261,8 | 17,47 |
| 28,9 | 1,37917 | 1,1233 | 295,3 | 262,9 | 17,55 |
| 29,0 | 1,37935 | 1,1239 | 296,7 | 264,0 | 17,63 |
| 29,1 | 1,37953 | 1,1244 | 298,1 | 265,1 | 17,71 |
| 29,2 | 1,37971 | 1,1250 | 299,4 | 266,1 | 17,79 |
| 29,3 | 1,37988 | 1,1254 | 300,4 | 266,9 | 17,85 |
| 29,4 | 1,38006 | 1,1258 | 301,4 | 267,7 | 17,91 |
| 29,5 | 1,38024 | 1,1263 | 302,8 | 268,8 | 17,99 |
| 29,6 | 1,38042 | 1,1269 | 304,1 | 269,9 | 18,07 |
| 29,7 | 1,38060 | 1,1273 | 305,1 | 270,6 | 18,13 |
| 29,8 | 1,38078 | 1,1277 | 306,1 | 271,4 | 18,19 |
| 29,9 | 1,38096 | 1,1282 | 307,4 | 272,5 | 18,26 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 30,0 | 1,39114 | 1,1288 | 308,8 | 273,6 | 18,35 |
| 30,1 | 1,38132 | 1,1293 | 310,0 | 274,5 | 18,42 |
| 30,2 | 1,38150 | 1,1298 | 311,2 | 275,5 | 18,49 |
| 30,3 | 1,38168 | 1,1302 | 312,4 | 276,4 | 18,56 |
| 30,4 | 1,38186 | 1,1307 | 313,6 | 277,3 | 18,63 |
| 30,5 | 1,38204 | 1,1312 | 314,8 | 278,3 | 18,70 |
| 30,6 | 1,38222 | 1,1317 | 316,0 | 279,2 | 18,77 |
| 30,7 | 1,38240 | 1,1322 | 317,2 | 280,2 | 18,85 |
| 30,8 | 1,38258 | 1,1327 | 318,4 | 281,1 | 18,92 |
| 30,9 | 1,38276 | 1,1332 | 319,6 | 282,0 | 18,99 |
| 31,0 | 1,38294 | 1,1336 | 320,8 | 283,0 | 19,06 |
| 31,1 | 1,38312 | 1,1341 | 322,0 | 283,9 | 19,13 |
| 31,2 | 1,38330 | 1,1346 | 323,2 | 284,9 | 19,20 |
| 31,3 | 1,38349 | 1,1351 | 324,4 | 285,8 | 19,27 |
| 31,4 | 1,38367 | 1,1356 | 325,6 | 286,8 | 19,35 |
| 31,5 | 1,38385 | 1,1361 | 326,8 | 287,7 | 19,42 |
| 31,6 | 1,38403 | 1,1366 | 328,1 | 288,6 | 19,49 |
| 31,7 | 1,38421 | 1,1371 | 329,3 | 289,6 | 19,56 |
| 31,8 | 1,38440 | 1,1376 | 330,5 | 290,5 | 19,64 |
| 31,9 | 1,38458 | 1,1380 | 331,7 | 291,5 | 19,71 |
| 32,0 | 1,38476 | 1,1385 | 332,9 | 292,4 | 19,78 |
| 32,1 | 1,38494 | 1,1391 | 334,2 | 293,4 | 19,86 |
| 32,2 | 1,38513 | 1,1396 | 335,5 | 294,4 | 19,93 |
| 32,3 | 1,38531 | 1,1401 | 336,7 | 295,4 | 20,00 |
| 32,4 | 1,38550 | 1,1406 | 338,0 | 296,4 | 20,08 |
| 32,5 | 1,38568 | 1,1411 | 339,3 | 297,3 | 20,16 |
| 32,6 | 1,38586 | 1,1416 | 340,6 | 298,3 | 20,24 |
| 32,7 | 1,38605 | 1,1422 | 341,9 | 299,3 | 20,31 |
| 32,8 | 1,38623 | 1,1427 | 343,1 | 300,3 | 20,38 |
| 32,9 | 1,38642 | 1,1432 | 344,4 | 301,3 | 20,46 |
| 33,0 | 1,38660 | 1,1437 | 345,7 | 302,3 | 20,54 |
| 33,1 | 1,38678 | 1,1442 | 346,9 | 303,2 | 20,61 |
| 33,2 | 1,38697 | 1,1447 | 348,1 | 304,1 | 20,68 |
| 33,3 | 1,38715 | 1,1452 | 349,3 | 305,0 | 20,75 |
| 33,4 | 1,38734 | 1,1457 | 350,5 | 305,9 | 20,82 |
| 33,5 | 1,38753 | 1,1461 | 351,7 | 306,9 | 20,90 |
| 33,6 | 1,38771 | 1,1466 | 352,9 | 307,8 | 20,97 |
| 33,7 | 1,38790 | 1,1471 | 354,1 | 308,7 | 21,04 |
| 33,8 | 1,38808 | 1,1476 | 355,3 | 309,6 | 21,11 |
| 33,9 | 1,38827 | 1,1481 | 356,5 | 310,5 | 21,18 |
| 34,0 | 1,38845 | 1,1486 | 357,7 | 311,4 | 21,25 |
| 34,1 | 1,38864 | 1,1491 | 359,0 | 312,4 | 21,33 |
| 34,2 | 1,38882 | 1,1496 | 360,3 | 313,4 | 21,41 |
| 34,3 | 1,38901 | 1,1501 | 361,5 | 314,3 | 21,48 |
| 34,4 | 1,38919 | 1,1506 | 362,8 | 315,3 | 21,55 |
| 34,5 | 1,38938 | 1,1512 | 364,1 | 316,3 | 21,63 |
| 34,6 | 1,38957 | 1,1517 | 365,4 | 317,3 | 21,71 |
| 34,7 | 1,38975 | 1,1522 | 366,7 | 318,2 | 21,79 |
| 34,8 | 1,38994 | 1,1527 | 367,9 | 319,2 | 21,86 |
| 34,9 | 1,39012 | 1,1532 | 369,2 | 320,2 | 21,94 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 35,0 | 1,39031 | 1,1537 | 370,5 | 321,1 | 22,01 |
| 35,1 | 1,39050 | 1,1543 | 371,8 | 322,1 | 22,09 |
| 35,2 | 1,39069 | 1,1548 | 373,0 | 323,0 | 22,16 |
| 35,3 | 1,39087 | 1,1553 | 374,3 | 324,0 | 22,24 |
| 35,4 | 1,39106 | 1,1558 | 375,6 | 325,0 | 22,32 |
| 35,5 | 1,39125 | 1,1563 | 376,9 | 325,9 | 22,39 |
| 35,6 | 1,39144 | 1,1568 | 378,1 | 326,9 | 22,45 |
| 35,7 | 1,39163 | 1,1573 | 379,4 | 327,8 | 22,54 |
| 35,8 | 1,39181 | 1,1579 | 360,7 | 328,8 | 22,62 |
| 35,9 | 1,39200 | 1,1584 | 381,9 | 329,7 | 22,69 |
| 36,0 | 1,39219 | 1,1589 | 383,2 | 330,7 | 22,77 |
| 36,1 | 1,39238 | 1,1594 | 384,5 | 331,6 | 22,85 |
| 36,2 | 1,39257 | 1,1599 | 385,8 | 332,6 | 22,92 |
| 36,3 | 1,39276 | 1,1604 | 387,0 | 333,5 | 22,99 |
| 36,4 | 1,39295 | 1,1610 | 386,3 | 334,5 | 23,07 |
| 36,5 | 1,39314 | 1,1615 | 389,6 | 335,4 | 23,15 |
| 36,6 | 1,39332 | 1,1620 | 390,9 | 336,4 | 23,22 |
| 36,7 | 1,39351 | 1,1625 | 392,2 | 337,3 | 23,30 |
| 36,8 | 1,39370 | 1,1630 | 393,4 | 338,3 | 23,37 |
| 36,9 | 1,39389 | 1,1635 | 394,7 | 339,2 | 23,45 |
| 37,0 | 1,39408 | 1,1641 | 396,0 | 340,2 | 23,53 |
| 37,1 | 1,39427 | 1,1646 | 397,3 | 341,1 | 23,60 |
| 37,2 | 1,39446 | 1,1651 | 396,6 | 342,1 | 23,86 |
| 37,3 | 1,39465 | 1,1656 | 399,8 | 343,0 | 23,75 |
| 37,4 | 1,39484 | 1,1661 | 401,1 | 344,0 | 23,83 |
| 37,5 | 1,39504 | 1,1666 | 402,4 | 344,9 | 23,91 |
| 37,6 | 1,39523 | 1,1672 | 403,7 | 345,9 | 23,99 |
| 37,7 | 1,39542 | 1,1677 | 405,0 | 346,8 | 24,06 |
| 37,8 | 1,39561 | 1,1682 | 406,2 | 347,7 | 24,13 |
| 37,9 | 1,39580 | 1,1687 | 407,5 | 348,7 | 24,21 |
| 38,0 | 1,39599 | 1,1692 | 408,8 | 349,6 | 24,29 |
| 38,1 | 1,39618 | 1,1698 | 410,1 | 350,6 | 24,37 |
| 38,2 | 1,39637 | 1,1703 | 411,3 | 351,5 | 24,44 |
| 38,3 | 1,39657 | 1,1708 | 412,6 | 352,4 | 24,51 |
| 38,4 | 1,39676 | 1,1713 | 413,9 | 353,4 | 24,59 |
| 38,5 | 1,39695 | 1,1718 | 415,2 | 354,3 | 24,67 |
| 38,6 | 1,39714 | 1,1723 | 416,4 | 355,2 | 24,74 |
| 38,7 | 1,39733 | 1,1728 | 417,7 | 356,1 | 24,82 |
| 38,8 | 1,39753 | 1,1733 | 419,0 | 357,1 | 24,90 |
| 38,9 | 1,39772 | 1,1739 | 420,2 | 358,0 | 24,97 |
| 39,0 | 1,39791 | 1,1744 | 421,5 | 358,9 | 25,04 |
| 39,1 | 1,39810 | 1,1749 | 422,8 | 359,8 | 25,12 |
| 39,2 | 1,39830 | 1,1754 | 424,1 | 360,8 | 25,20 |
| 39,3 | 1,39849 | 1,1759 | 425,3 | 361,7 | 25,27 |
| 39,4 | 1,39869 | 1,1764 | 426,6 | 362,6 | 25,35 |
| 39,5 | 1,39888 | 1,1770 | 427,9 | 363,6 | 25,42 |
| 39,6 | 1,39907 | 1,1775 | 429,2 | 364,5 | 25,50 |
| 39,7 | 1,39927 | 1,1780 | 430,5 | 365,4 | 25,58 |
| 39,8 | 1,39946 | 1,1785 | 431,7 | 366,3 | 25,65 |
| 39,9 | 1,39966 | 1,1790 | 433,0 | 367,3 | 25,73 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 40,0 | 1,39985 | 1,1796 | 434,3 | 368,2 | 25,80 |
| 40,1 | 1,40004 | 1,1801 | 435,6 | 369,2 | 25,88 |
| 40,2 | 1,40024 | 1,1806 | 437,0 | 370,1 | 25,96 |
| 40,3 | 1,40043 | 1,1812 | 438,3 | 371,1 | 26,04 |
| 40,4 | 1,40063 | 1,1817 | 439,7 | 372,1 | 26,12 |
| 40,5 | 1,40083 | 1,1823 | 441,0 | 373,0 | 26,20 |
| 40,6 | 1,40102 | 1,1828 | 442,3 | 374,0 | 26,28 |
| 40,7 | 1,40122 | 1,1833 | 443,7 | 374,9 | 26,36 |
| 40,8 | 1,40141 | 1,1839 | 445,0 | 375,9 | 26,44 |
| 40,9 | 1,40161 | 1,1844 | 446,4 | 376,9 | 26,52 |
| 41,0 | 1,40180 | 1,1850 | 447,7 | 377,8 | 26,60 |
| 41,1 | 1,40200 | 1,1855 | 449,0 | 378,7 | 26,68 |
| 41,2 | 1,40219 | 1,1860 | 450,2 | 379,6 | 26,75 |
| 41,3 | 1,40239 | 1,1865 | 451,5 | 380,5 | 26,83 |
| 41,4 | 1,40259 | 1,1870 | 452,8 | 381,4 | 26,90 |
| 41,5 | 1,40279 | 1,1875 | 454,1 | 382,3 | 26,98 |
| 41,6 | 1,40298 | 1,1881 | 455,3 | 383,2 | 27,05 |
| 41,7 | 1,40318 | 1,1886 | 456,6 | 384,2 | 27,13 |
| 41,8 | 1,40338 | 1,1891 | 457,9 | 385,1 | 27,21 |
| 41,9 | 1,40357 | 1,1896 | 459,1 | 386,0 | 27,28 |
| 42,0 | 1,40377 | 1,1901 | 460,4 | 386,9 | 27,35 |
| 42,1 | 1,40397 | 1,1907 | 461,7 | 387,8 | 27,43 |
| 42,2 | 1,40417 | 1,1912 | 463,1 | 388,8 | 27,52 |
| 42,3 | 1,40436 | 1,1917 | 464,4 | 389,7 | 27,59 |
| 42,4 | 1,40456 | 1,1923 | 465,8 | 390,7 | 27,68 |
| 42,5 | 1,40476 | 1,1928 | 467,2 | 391,6 | 27,76 |
| 42,6 | 1,40496 | 1,1934 | 468,5 | 392,6 | 27,84 |
| 42,7 | 1,40516 | 1,1939 | 469,9 | 393,5 | 27,92 |
| 42,8 | 1,40535 | 1,1945 | 471,2 | 394,5 | 28,00 |
| 42,9 | 1,40555 | 1,1950 | 472,6 | 395,4 | 28,08 |
| 43,0 | 1,40575 | 1,1956 | 473,9 | 396,4 | 28,16 |
| 43,1 | 1,40595 | 1,1961 | 475,2 | 397,3 | 28,23 |
| 43,2 | 1,40615 | 1,1967 | 476,6 | 398,3 | 28,32 |
| 43,3 | 1,40635 | 1,1972 | 477,9 | 399,2 | 28,40 |
| 43,4 | 1,40655 | 1,1977 | 479,3 | 400,1 | 28,48 |
| 43,5 | 1,40675 | 1,1983 | 480,6 | 401,1 | 28,56 |
| 43,6 | 1,40695 | 1,1988 | 481,9 | 402,0 | 28,63 |
| 43,7 | 1,40715 | 1,1994 | 483,3 | 402,9 | 28,72 |
| 43,8 | 1,40735 | 1,1999 | 484,6 | 403,9 | 28,79 |
| 43,9 | 1,40755 | 1,2005 | 486,0 | 404,8 | 28,88 |
| 44,0 | 1,40775 | 1,2010 | 487,3 | 405,7 | 28,95 |
| 44,1 | 1,40795 | 1,2015 | 488,6 | 406,7 | 29,03 |
| 44,2 | 1,40815 | 1,2021 | 490,0 | 407,6 | 29,11 |
| 44,3 | 1,40836 | 1,2026 | 491,3 | 408,5 | 29,19 |
| 44,4 | 1,40856 | 1,2032 | 492,7 | 409,5 | 29,27 |
| 44,5 | 1,40876 | 1,2037 | 494,0 | 410,4 | 29,35 |
| 44,6 | 1,40896 | 1,2042 | 495,3 | 411,3 | 29,43 |
| 44,7 | 1,40916 | 1,2048 | 496,7 | 412,3 | 29,51 |
| 44,8 | 1,40937 | 1,2053 | 498,0 | 413,2 | 29,59 |
| 44,9 | 1,40957 | 1,2059 | 499,4 | 414,1 | 29,67 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 45,0 | 1,40977 | 1,2064 | 500,7 | 415,0 | 29,75 |
| 45,1 | 1,40997 | 1,2070 | 502,1 | 416,0 | 29,83 |
| 45,2 | 1,41018 | 1,2076 | 503,5 | 417,0 | 29,92 |
| 45,3 | 1,41038 | 1,2081 | 504,9 | 417,9 | 30,00 |
| 45,4 | 1,41059 | 1,2087 | 506,3 | 418,9 | 30,08 |
| 45,5 | 1,41079 | 1,2093 | 507,8 | 419,9 | 30,17 |
| 45,6 | 1,41099 | 1,2098 | 509,2 | 420,9 | 30,25 |
| 45,7 | 1,41119 | 1,2104 | 510,6 | 421,8 | 30,34 |
| 45,8 | 1,41139 | 1,2110 | 512,0 | 422,8 | 30,42 |
| 45,9 | 1,41160 | 1,2115 | 513,4 | 423,7 | 30,50 |
| 46,0 | 1,41180 | 1,2121 | 514,8 | 424,7 | 30,39 |
| 46,1 | 1,41200 | 1,2127 | 516,1 | 425,6 | 30,66 |
| 46,2 | 1,41221 | 1,2132 | 517,5 | 426,5 | 30,75 |
| 46,3 | 1,41241 | 1,2137 | 518,8 | 427,5 | 30,82 |
| 46,4 | 1,41262 | 1,2143 | 520,2 | 428,4 | 30,91 |
| 46,5 | 1,41282 | 1,2148 | 521,5 | 429,3 | 30,99 |
| 46,6 | 1,41302 | 1,2154 | 522,8 | 430,2 | 31,06 |
| 46,7 | 1,41323 | 1,2159 | 524,2 | 431,1 | 31,15 |
| 46,8 | 1,41343 | 1,2165 | 525,5 | 432,0 | 31,22 |
| 46,9 | 1,41364 | 1,2170 | 526,9 | 432,9 | 31,31 |
| 47,0 | 1,41384 | 1,2175 | 528,2 | 433,8 | 31,38 |
| 47,1 | 1,41405 | 1,2181 | 529,6 | 434,8 | 31,47 |
| 47,2 | 1,41425 | 1,2187 | 531,0 | 435,7 | 31,55 |
| 47,3 | 1,41446 | 1,2192 | 532,4 | 436,7 | 31,63 |
| 47,4 | 1,41466 | 1,2198 | 533,8 | 437,6 | 31,72 |
| 47,5 | 1,41487 | 1,2204 | 535,3 | 438,6 | 31,81 |
| 47,6 | 1,41508 | 1,2210 | 536,7 | 439,5 | 31,07 |
| 47,7 | 1,41528 | 1,2215 | 538,1 | 440,5 | 31,97 |
| 47,8 | 1,41549 | 1,2221 | 539,5 | 441,4 | 32,05 |
| 47,9 | 1,41569 | 1,2227 | 540,9 | 442,4 | 32,14 |
| 48,0 | 1,41590 | 1,2232 | 542,3 | 443,3 | 32,22 |
| 48,1 | 1,41611 | 1,2238 | 543,6 | 444,2 | 32,30 |
| 48,2 | 1,41632 | 1,2243 | 545,0 | 445,1 | 32,38 |
| 48,3 | 1,41652 | 1,2249 | 546,3 | 446,0 | 32,46 |
| 48,4 | 1,41673 | 1,2254 | 547,7 | 446,9 | 32,59 |
| 48,5 | 1,41694 | 1,2260 | 549,1 | 447,8 | 32,63 |
| 48,6 | 1,41715 | 1,2265 | 550,4 | 448,7 | 32,70 |
| 48,7 | 1,41736 | 1,2271 | 551,8 | 449,7 | 32,79 |
| 48,8 | 1,41756 | 1,2276 | 553,1 | 450,6 | 32,86 |
| 48,9 | 1,41777 | 1,2282 | 554,5 | 451,4 | 32,95 |
| 49,0 | 1,41798 | 1,2287 | 555,8 | 452,3 | 33,02 |
| 49,1 | 1,41819 | 1,2293 | 557,2 | 453,3 | 33,11 |
| 49,2 | 1,41840 | 1,2298 | 558,6 | 454,2 | 33,19 |
| 49,3 | 1,41861 | 1,2304 | 560,0 | 455,1 | 33,27 |
| 49,4 | 1,41882 | 1,2310 | 561,4 | 456,1 | 33,36 |
| 49,5 | 1,41903 | 1,2315 | 562,8 | 457,0 | 33,44 |
| 49,6 | 1,41924 | 1,2221 | 564,2 | 457,9 | 33,52 |
| 49,7 | 1,41945 | 1,2327 | 565,6 | 458,8 | 33,61 |
| 49,8 | 1,41966 | 1,2332 | 567,0 | 459,8 | 33,69 |
| 49,9 | 1,41987 | 1,2338 | 568,4 | 460,7 | 33,77 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 50,0 | 1,42008 | 1,2344 | 569,8 | 461,6 | 33,86 |
| 50,1 | 1,42029 | 1,2349 | 571,2 | 462,5 | 33,94 |
| 50,2 | 1,42050 | 1,2355 | 572,6 | 463,5 | 34,02 |
| 50,3 | 1,42071 | 1,2361 | 574,0 | 464,4 | 34,10 |
| 50,4 | 1,42092 | 1,2366 | 575,4 | 465,3 | 34,19 |
| 50,5 | 1,42114 | 1,2372 | 576,9 | 466,2 | 34,28 |
| 50,6 | 1,42135 | 1,2378 | 578,3 | 467,2 | 34,36 |
| 50,7 | 1,42156 | 1,2384 | 579,7 | 468,1 | 34,44 |
| 50,8 | 1,42177 | 1,2389 | 581,1 | 469,0 | 34,53 |
| 50,9 | 1,42198 | 1,2395 | 582,5 | 469,9 | 34,61 |
| 51,0 | 1,42219 | 1,2401 | 583,9 | 470,9 | 34,69 |
| 51,1 | 1,42240 | 1,2407 | 585,4 | 471,8 | 34,78 |
| 51,2 | 1,42261 | 1,2413 | 586,9 | 472,8 | 34,87 |
| 51,3 | 1,42283 | 1,2419 | 588,3 | 473,8 | 34,95 |
| 51,4 | 1,42304 | 1,2425 | 589,8 | 474,7 | 35,04 |
| 51,5 | 1,42325 | 1,2431 | 591,3 | 475,7 | 35,13 |
| 51,6 | 1,42346 | 1,2437 | 592,8 | 476,6 | 35,22 |
| 51,7 | 1,47367 | 1,2443 | 594,3 | 477,6 | 35,31 |
| 51,8 | 1,42389 | 1,2449 | 595,7 | 478,6 | 35,39 |
| 51,9 | 1,42410 | 1,2455 | 597,2 | 479,5 | 35,48 |
| 52,0 | 1,42431 | 1,2461 | 598,7 | 480,5 | 35,57 |
| 52,1 | 1,42452 | 1,2466 | 600,1 | 481,4 | 35,65 |
| 52,2 | 1,42474 | 1,2472 | 601,5 | 482,3 | 35,74 |
| 52,3 | 1,42495 | 1,2478 | 602,9 | 483,2 | 35,82 |
| 52,4 | 1,42517 | 1,2483 | 604,3 | 484,1 | 35,91 |
| 52,5 | 1,42538 | 1,2499 | 605,8 | 485,0 | 35,99 |
| 52,6 | 1,42559 | 1,2495 | 607,2 | 485,9 | 36,09 |
| 52,7 | 1,42581 | 1,2500 | 608,6 | 486,8 | 36,16 |
| 52,8 | 1,42602 | 1,2506 | 610,0 | 487,7 | 36,24 |
| 52,9 | 1,42624 | 1,2512 | 611,4 | 488,6 | 36,33 |
| 53,0 | 1,42645 | 1,2518 | 612,8 | 489,6 | 36,41 |
| 53,1 | 1,42666 | 1,2524 | 614,3 | 490,5 | 36,50 |
| 53,2 | 1,42686 | 1,2530 | 615,8 | 491,4 | 36,59 |
| 53,3 | 1,42707 | 1,2536 | 617,2 | 492,4 | 36,67 |
| 53,4 | 1,42727 | 1,2542 | 618,7 | 493,3 | 36,76 |
| 53,5 | 1,42748 | 1,2548 | 620,2 | 494,3 | 36,85 |
| 53,6 | 1,42769 | 1,2554 | 621,7 | 495,2 | 36,94 |
| 53,7 | 1,42789 | 1,2560 | 623,2 | 496,2 | 37,03 |
| 53,8 | 1,42810 | 1,2566 | 624,6 | 497,1 | 37,11 |
| 53,9 | 1,42830 | 1,2571 | 626,1 | 498,0 | 37,20 |
| 54,0 | 1,42851 | 1,2577 | 627,6 | 499,0 | 37,29 |
| 54,1 | 1,42874 | 1,2583 | 629,0 | 499,9 | 37,37 |
| 54,2 | 1,42897 | 1,2589 | 630,4 | 500,8 | 37,45 |
| 54,3 | 1,42919 | 1,2595 | 631,8 | 501,7 | 37,54 |
| 54,4 | 1,42942 | 1,2600 | 633,2 | 502,6 | 37,62 |
| 54,5 | 1,42965 | 1,2606 | 634,7 | 503,5 | 37,71 |
| 54,6 | 1,42988 | 1,2612 | 636,1 | 504,3 | 37,79 |
| 54,7 | 1,43011 | 1,2617 | 637,5 | 505,2 | 37,88 |
| 54,8 | 1,43033 | 1,2623 | 638,9 | 506,1 | 37,96 |
| 54,9 | 1,43056 | 1,2629 | 640,3 | 507,0 | 39,04 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 55,0 | 1,43079 | 1,2635 | 641,7 | 507,9 | 38,11 |
| 55,1 | 1,43101 | 1,2640 | 643,2 | 508,8 | 38,22 |
| 55,2 | 1,43123 | 1,2646 | 644,6 | 509,7 | 38,30 |
| 55,3 | 1,43145 | 1,2652 | 646,1 | 510,7 | 38,39 |
| 55,4 | 1,43167 | 1,2658 | 647,6 | 511,6 | 38,48 |
| 55,5 | 1,43189 | 1,2664 | 649,1 | 512,5 | 38,57 |
| 55,6 | 1,43210 | 1,2670 | 650,5 | 513,4 | 38,65 |
| 55,7 | 1,43232 | 1,2676 | 652,0 | 514,3 | 38,74 |
| 55,8 | 1,43254 | 1,2682 | 653,5 | 515,3 | 38,83 |
| 55,9 | 1,43276 | 1,2688 | 654,9 | 516,2 | 38,91 |
| 56,0 | 1,43298 | 1,2694 | 656,4 | 517,1 | 39,00 |
| 56,1 | 1,43320 | 1,2700 | 657,9 | 518,0 | 39,09 |
| 56,2 | 1,43342 | 1,2706 | 659,4 | 518,9 | 39,18 |
| 56,3 | 1,43364 | 1,2712 | 660,8 | 519,9 | 39,26 |
| 56,4 | 1,43386 | 1,2718 | 662,3 | 520,8 | 39,35 |
| 56,5 | 1,43409 | 1,2724 | 663,8 | 521,7 | 39,44 |
| 56,6 | 1,43431 | 1,2730 | 665,3 | 522,6 | 39,53 |
| 56,7 | 1,43453 | 1,2736 | 666,8 | 523,5 | 39,62 |
| 56,8 | 1,43475 | 1,2742 | 668,2 | 524,4 | 39,70 |
| 56,9 | 1,43497 | 1,2748 | 669,7 | 525,4 | 39,79 |
| 57,0 | 1,43519 | 1,2754 | 671,2 | 526,3 | 39,88 |
| 57,1 | 1,43541 | 1,2760 | 672,7 | 527,2 | 39,97 |
| 57,2 | 1,43563 | 1,2766 | 674,3 | 528,2 | 40,06 |
| 57,3 | 1,43586 | 1,2773 | 675,8 | 529,1 | 40,15 |
| 57,4 | 1,43608 | 1,2779 | 677,4 | 530,1 | 40,25 |
| 57,5 | 1,43630 | 1,2785 | 678,9 | 531,0 | 40,34 |
| 57,6 | 1,43652 | 1,2791 | 680,4 | 532,0 | 40,43 |
| 57,7 | 1,43674 | 1,2797 | 682,0 | 532,9 | 40,52 |
| 57,8 | 1,43697 | 1,2804 | 683,5 | 533,8 | 40,61 |
| 57,9 | 1,43719 | 1,2810 | 685,1 | 534,8 | 40,70 |
| 58,0 | 1,43741 | 1,2816 | 686,6 | 535,7 | 40,80 |
| 58,1 | 1,43763 | 1,2822 | 688,1 | 536,6 | 40,88 |
| 58,2 | 1,43786 | 1,2828 | 689,6 | 537,5 | 40,97 |
| 58,3 | 1,43808 | 1,2834 | 691,0 | 538,4 | 41,06 |
| 58,4 | 1,43831 | 1,2840 | 692,5 | 539,3 | 41,14 |
| 58,5 | 1,43854 | 1,2846 | 694,0 | 540,2 | 41,23 |
| 58,6 | 1,43876 | 1,2852 | 695,5 | 541,1 | 41,32 |
| 58,7 | 1,43899 | 1,2858 | 697,0 | 542,0 | 41,41 |
| 58,8 | 1,43921 | 1,2864 | 698,4 | 542,9 | 41,50 |
| 58,9 | 1,43944 | 1,2870 | 699,9 | 543,8 | 41,58 |
| 59,0 | 1,43966 | 1,2876 | 701,4 | 544,7 | 41,67 |
| 59,1 | 1,43989 | 1,2882 | 702,9 | 545,7 | 41,76 |
| 59,2 | 1,44011 | 1,2888 | 704,5 | 546,6 | 41,86 |
| 59,3 | 1,44034 | 1,2895 | 706,0 | 547,5 | 41,95 |
| 59,4 | 1,44056 | 1,2901 | 707,6 | 548,5 | 42,04 |
| 59,5 | 1,44079 | 1,2907 | 709,1 | 549,4 | 42,13 |
| 59,6 | 1,44102 | 1,2913 | 710,6 | 550,3 | 42,22 |
| 59,7 | 1,44124 | 1,2920 | 712,2 | 551,2 | 42,32 |
| 59,8 | 1,44147 | 1,2926 | 713,7 | 552,2 | 42,41 |
| 59,9 | 1,44169 | 1,2932 | 715,3 | 553,1 | 42,50 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 60,0 | 1,44192 | 1,2938 | 716,8 | 554,0 | 42,59 |
| 60,1 | 1,44215 | 1,2944 | 718,3 | 554,9 | 42,68 |
| 60,2 | 1,44237 | 1,2950 | 719,8 | 555,8 | 42,77 |
| 60,3 | 1,44260 | 1,2956 | 721,2 | 556,7 | 42,85 |
| 60,4 | 1,44283 | 1,2962 | 722,7 | 557,6 | 42,94 |
| 60,5 | 1,44306 | 1,2968 | 724,2 | 558,4 | 43,03 |
| 60,6 | 1,44328 | 1,2974 | 725,7 | 559,3 | 43,12 |
| 60,7 | 1,44351 | 1,2980 | 727,2 | 560,2 | 43,21 |
| 60,8 | 1,44374 | 1,2986 | 728,6 | 561,1 | 43,29 |
| 60,9 | 1,44396 | 1,2992 | 730,1 | 562,0 | 43,38 |
| 61,0 | 1,44419 | 1,2998 | 731,6 | 562,8 | 43,47 |
| 61,1 | 1,44442 | 1,3004 | 733,1 | 563,8 | 43,56 |
| 61,2 | 1,44465 | 1,3011 | 734,7 | 564,7 | 43,65 |
| 61,3 | 1,44488 | 1,3017 | 736,2 | 565,6 | 43,74 |
| 61,4 | 1,44511 | 1,3023 | 737,8 | 566,5 | 43,84 |
| 61,5 | 1,44533 | 1,3030 | 739,4 | 567,4 | 43,93 |
| 61,6 | 1,44556 | 1,3036 | 740,9 | 568,4 | 44,02 |
| 61,7 | 1,44579 | 1,3042 | 742,5 | 569,3 | 44,12 |
| 61,8 | 1,44602 | 1,3048 | 744,0 | 570,2 | 44,21 |
| 61,9 | 1,44625 | 1,3055 | 745,6 | 571,1 | 44,30 |
| 62,0 | 1,44648 | 1,3061 | 747,1 | 572,0 | 44,39 |
| 62,1 | 1,44671 | 1,3067 | 748,6 | 572,9 | 44,48 |
| 62,2 | 1,44694 | 1,3073 | 750,2 | 573,8 | 44,57 |
| 62,3 | 1,44717 | 1,3080 | 751,7 | 574,7 | 44,66 |
| 62,4 | 1,44740 | 1,3086 | 753,3 | 575,6 | 44,76 |
| 62,5 | 1,44764 | 1,3092 | 754,8 | 576,5 | 44,85 |
| 62,6 | 1,44787 | 1,3098 | 756,3 | 577,4 | 44,94 |
| 62,7 | 1,44810 | 1,3104 | 757,9 | 578,3 | 45,03 |
| 62,8 | 1,44833 | 1,3111 | 759,4 | 579,2 | 45,12 |
| 62,9 | 1,44856 | 1,3117 | 761,0 | 580,1 | 45,21 |
| 63,0 | 1,44879 | 1,3123 | 762,5 | 581,0 | 45,31 |
| 63,1 | 1,44902 | 1,3130 | 764,1 | 582,0 | 45,40 |
| 63,2 | 1,44926 | 1,3136 | 765,7 | 582,9 | 45,49 |
| 63,3 | 1,44949 | 1,3143 | 767,3 | 583,8 | 45,59 |
| 63,4 | 1,44972 | 1,3149 | 768,9 | 584,8 | 45,69 |
| 63,5 | 1,44996 | 1,3156 | 770,6 | 585,7 | 45,79 |
| 63,6 | 1,45019 | 1,3162 | 772,2 | 586,6 | 45,88 |
| 63,7 | 1,45042 | 1,3169 | 773,8 | 587,6 | 45,98 |
| 63,8 | 1,45065 | 1,3175 | 775,4 | 588,5 | 46,07 |
| 63,9 | 1,45089 | 1,3182 | 777,0 | 589,4 | 46,17 |
| 64,0 | 1,45112 | 1,3188 | 778,6 | 590,4 | 46,26 |
| 64,1 | 1,45135 | 1,3195 | 780,1 | 591,3 | 46,35 |
| 64,2 | 1,45159 | 1,3201 | 781,7 | 592,1 | 46,45 |
| 64,3 | 1,45183 | 1,3207 | 783,2 | 593,0 | 46,53 |
| 64,4 | 1,45206 | 1,3213 | 784,8 | 593,9 | 46,63 |
| 64,5 | 1,45230 | 1,3219 | 786,3 | 594,8 | 46,72 |
| 64,6 | 1,45253 | 1,3226 | 787,8 | 595,7 | 46,81 |
| 64,7 | 1,45276 | 1,3232 | 789,4 | 596,6 | 46,90 |
| 64,8 | 1,45300 | 1,3238 | 790,9 | 597,5 | 46,99 |
| 64,9 | 1,45324 | 1,3244 | 792,5 | 598,3 | 47,09 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 65,0 | 1,45347 | 1,3251 | 794,0 | 599,2 | 47,18 |
| 65,1 | 1,45371 | 1,3257 | 795,6 | 600,1 | 47,27 |
| 65,2 | 1,45394 | 1,3264 | 797,2 | 601,1 | 47,37 |
| 65,3 | 1,45418 | 1,3270 | 798,8 | 602,0 | 47,46 |
| 65,4 | 1,45441 | 1,3277 | 800,4 | 602,9 | 47,56 |
| 65,5 | 1,45465 | 1,3283 | 802,1 | 603,8 | 47,66 |
| 65,6 | 1,45489 | 1,3290 | 803,7 | 604,7 | 47,75 |
| 65,7 | 1,45512 | 1,3296 | 805,3 | 605,6 | 47,85 |
| 65,8 | 1,14536 | 1,3303 | 806,9 | 606,6 | 47,94 |
| 65,9 | 1,45559 | 1,3309 | 808,5 | 607,5 | 48,04 |
| 66,0 | 1,45583 | 1,3316 | 810,1 | 608,4 | 48,13 |
| 66,1 | 1,45607 | 1,3322 | 811,6 | 609,3 | 48,22 |
| 66,2 | 1,45630 | 1,3328 | 813,2 | 610,1 | 48,32 |
| 66,3 | 1,45654 | 1,3335 | 814,8 | 611,0 | 48,41 |
| 66,4 | 1,45678 | 1,3341 | 816,3 | 611,9 | 48,50 |
| 66,5 | 1,45702 | 1,3347 | 817,9 | 612,8 | 48,60 |
| 66,6 | 1,45725 | 1,3353 | 819,4 | 613,6 | 48,69 |
| 66,7 | 1,45749 | 1,3360 | 820,9 | 614,5 | 48,77 |
| 66,8 | 1,45773 | 1,3366 | 822,5 | 615,4 | 48,87 |
| 66,9 | 1,45796 | 1,3372 | 824,1 | 616,2 | 48,97 |
| 67,0 | 1,45820 | 1,3378 | 825,6 | 617,1 | 49,05 |
| 67,1 | 1,45844 | 1,3385 | 827,2 | 618,0 | 49,15 |
| 67,2 | 1,45868 | 1,3391 | 828,8 | 618,9 | 49,24 |
| 67,3 | 1,45892 | 1,3398 | 830,4 | 619,8 | 49,34 |
| 67,4 | 1,45916 | 1,3404 | 832,0 | 620,7 | 49,43 |
| 67,5 | 1,45940 | 1,3411 | 833,7 | 621,6 | 49,53 |
| 67,6 | 1,45964 | 1,3418 | 835,3 | 622,5 | 49,63 |
| 67,7 | 1,45988 | 1,3424 | 836,9 | 623,4 | 49,73 |
| 67,8 | 1,46012 | 1,3431 | 838,5 | 624,3 | 49,82 |
| 67,9 | 1,46036 | 1,3437 | 840,1 | 625,2 | 49,92 |
| 68,0 | 1,46060 | 1,3444 | 841,7 | 626,1 | 50,01 |
| 68,1 | 1,46084 | 1,3450 | 843,4 | 627,0 | 50,11 |
| 68,2 | 1,46108 | 1,3457 | 845,1 | 628,0 | 50,21 |
| 68,3 | 1,46132 | 1,3464 | 846,7 | 628,9 | 50,31 |
| 68,4 | 1,46156 | 1,3471 | 848,4 | 629,8 | 50,41 |
| 68,5 | 1,46181 | 1,3478 | 850,1 | 630,8 | 50,51 |
| 68,6 | 1,46205 | 1,3484 | 851,8 | 631,7 | 50,61 |
| 68,7 | 1,46229 | 1,3491 | 853,5 | 632,6 | 50,71 |
| 68,8 | 1,46253 | 1,3498 | 855,1 | 633,5 | 50,81 |
| 68,9 | 1,46277 | 1,3505 | 856,8 | 634,5 | 50,91 |
| 69,0 | 1,46301 | 1,3512 | 858,5 | 635,4 | 51,01 |
| 69,1 | 1,46325 | 1,3518 | 860,1 | 636,3 | 51,10 |
| 69,2 | 1,46350 | 1,3525 | 861,7 | 637,2 | 51,20 |
| 69,3 | 1,46374 | 1,3531 | 863,3 | 638,0 | 51,29 |
| 69,4 | 1,46398 | 1,3538 | 864,9 | 638,9 | 51,39 |
| 69,5 | 1,46423 | 1,3544 | 866,6 | 639,8 | 51,49 |
| 69,6 | 1,46447 | 1,3551 | 868,2 | 640,7 | 51,58 |
| 69,7 | 1,46471 | 1,3557 | 869,8 | 641,6 | 51,68 |
| 69,8 | 1,46495 | 1,3564 | 871,4 | 642,4 | 51,78 |
| 69,9 | 1,46520 | 1,3570 | 873,0 | 643,3 | 51,87 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 70,0 | 1,46544 | 1,3577 | 874,6 | 644,2 | 51,97 |
| 70,1 | 1,46568 | 1,3583 | 876,2 | 645,1 | 52,06 |
| 70,2 | 1,46593 | 1,3590 | 877,8 | 645,9 | 52,15 |
| 70,3 | 1,46618 | 1,3596 | 879,4 | 646,8 | 52,25 |
| 70,4 | 1,46642 | 1,3603 | 881,0 | 647,7 | 52,35 |
| 70,5 | 1,46667 | 1,3609 | 882,7 | 648,6 | 52,45 |
| 70,6 | 1,46691 | 1,3616 | 884,3 | 649,4 | 52,54 |
| 70,7 | 1,46715 | 1,3622 | 885,9 | 650,3 | 52,64 |
| 70,8 | 1,46740 | 1,3629 | 887,5 | 651,2 | 52,73 |
| 70,9 | 1,46765 | 1,3635 | 889,1 | 652,1 | 52,83 |
| 71,0 | 1,46789 | 1,3642 | 890,7 | 652,9 | 52,92 |
| 71,1 | 1,46814 | 1,3649 | 892,4 | 653,8 | 53,02 |
| 71,2 | 1,46838 | 1,3655 | 894,1 | 654,7 | 53,12 |
| 71,3 | 1,46863 | 1,3662 | 895,7 | 655,6 | 53,22 |
| 71,4 | 1,46888 | 1,3669 | 897,4 | 656,5 | 53,32 |
| 71,5 | 1,46913 | 1,3676 | 899,1 | 657,4 | 53,42 |
| 71,6 | 1,46937 | 1,3683 | 900,8 | 658,3 | 53,52 |
| 71,7 | 1,46962 | 1,3689 | 902,5 | 659,2 | 53,62 |
| 71,8 | 1,46987 | 1,3696 | 904,1 | 660,1 | 53,72 |
| 71,9 | 1,47011 | 1,3703 | 905,8 | 661,0 | 53,82 |
| 72,0 | 1,47036 | 1,3710 | 907,5 | 661,9 | 53,92 |
| 72,1 | 1,47061 | 1,3717 | 909,2 | 662,8 | 54,02 |
| 72,2 | 1,47086 | 1,3723 | 910,8 | 663,7 | 54,12 |
| 72,3 | 1,47110 | 1,3730 | 912,5 | 664,6 | 54,22 |
| 72,4 | 1,47135 | 1,3737 | 914,2 | 665,5 | 54,32 |
| 72,5 | 1,47160 | 1,3744 | 915,9 | 666,4 | 54,42 |
| 72,6 | 1,47185 | 1,3750 | 917,5 | 667,3 | 54,51 |
| 72,7 | 1,47210 | 1,3757 | 919,2 | 668,2 | 54,62 |
| 72,8 | 1,47234 | 1,3764 | 920,9 | 669,0 | 54,72 |
| 72,9 | 1,47259 | 1,3771 | 922,5 | 669,9 | 54,81 |
| 73,0 | 1,47284 | 1,3777 | 924,2 | 670,8 | 54,91 |
| 73,1 | 1,47309 | 1,3784 | 925,9 | 671,7 | 55,01 |
| 73,2 | 1,47334 | 1,3791 | 927,6 | 672,6 | 55,11 |
| 73,3 | 1,47359 | 1,3798 | 929,2 | 673,5 | 55,21 |
| 73,4 | 1,47384 | 1,3804 | 930,9 | 674,4 | 55,31 |
| 73,5 | 1,47409 | 1,3811 | 932,6 | 675,2 | 55,41 |
| 73,6 | 1,47434 | 1,3818 | 934,3 | 676,1 | 55,51 |
| 73,7 | 1,47459 | 1,3825 | 936,0 | 677,0 | 55,61 |
| 73,8 | 1,47484 | 1,3832 | 937,6 | 677,9 | 55,71 |
| 73,9 | 1,47509 | 1,3838 | 939,3 | 678,8 | 55,81 |
| 74,0 | 1,47534 | 1,3845 | 941,0 | 679,7 | 55,91 |
| 74,1 | 1,47559 | 1,3852 | 942,7 | 680,5 | 56,01 |
| 74,2 | 1,47584 | 1,3859 | 944,4 | 681,4 | 56,11 |
| 74,3 | 1,47609 | 1,3866 | 946,0 | 682,3 | 56,21 |
| 74,4 | 1,47634 | 1,3872 | 947,7 | 683,2 | 56,31 |
| 74,5 | 1,47660 | 1,3879 | 949,4 | 684,0 | 56,41 |
| 74,6 | 1,47685 | 1,3886 | 951,1 | 684,9 | 56,51 |
| 74,7 | 1,47710 | 1,3893 | 952,8 | 685,8 | 56,61 |
| 74,8 | 1,47735 | 1,3900 | 954,4 | 686,7 | 56,71 |
| 74,9 | 1,47760 | 1,3906 | 956,1 | 687,5 | 56,81 |

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ALKOHOLU W PROCENTACH OBJĘTOŚCIOWYCH

Oznaczanie zawartości alkoholu w procentach objętościowych (% obj.) polega na wykonaniu destylacji wina, uprzednio zalkalizowanego za pomocą zawiesiny wodorotlenku wapnia, i piknometrycznym oznaczeniu gęstości destylatu. Zawartości alkoholu odczytuje się z tabel alkoholometrycznych.

1. APARATURA I SPRZĘT

Do oznaczania zawartości alkoholu stosuje się sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

- 1) zestaw do destylacji składający się z litrowej kolby okrągłodennej ze szlifem, kolumny rektyfikacyjnej o wysokości około 20 cm lub innego urządzenia zapobiegającego rozpryskiwaniu cieczy, źródła ciepła, chłodnicy zakończonej przedłużaczem doprowadzającym destylat na dno kolby miarowej lub
- 2) zestaw do destylacji z parą wodną, składający się z wytwornicy pary, przewodu pary, kolumny rektyfikacyjnej i chłodnicy;
- 3) piknometr.

Dopuszcza się użycie dowolnego typu aparatu do destylacji bez pary wodnej lub z parą wodną, o ile spełni wymagania testu, w którym przeprowadza się pięć kolejnych destylacji mieszaniny alkoholowo-wodnej o zawartości alkoholu 10 % obj., przy czym zawartość alkoholu w destylacie po pięciu destylacjach powinna wynosić co najmniej 9,9 % obj., a straty alkoholu w każdej destylacji nie mogą przekraczać 0,02 % obj.

2. ODCZYNNIKI

Dwumolowa zawiesina wodorotlenku wapnia, otrzymana przez stopniowe dodawanie do 120 g wapnia niegaszonego (CaO) litra wody o temperaturze od 60 do 70 °C.

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII

Z wina usuwa się większość dwutlenku węgla przez mieszanie próbki wina o objętości 250 do 300 ml w kolbie o pojemności 500 ml.

Następnie za pomocą kolby miarowej odmierza się 200 ml wina, które przenosi się następnie do kolby destylacyjnej. Kolbę miarową przemywa się czterokrotnie 5 ml porcjami wody, zlewając ją do kolby destylacyjnej lub do przewodu pary. Do kolby destylacyjnej wprowadza się przewód pary zestawu do destylacji z parą wodną. Następnie dodaje się 10 ml zawiesiny wodorotlenku wapnia i kilka odłamków obojętnego materiału porowatego takiego jak pumeks.

Destylat zbiera się w tej samej 200 ml kolbie miarowej używanej do odmierzania wina. Destylat zbiera się w ilości około 3/4 wyjściowej objętości wina w przypadku destylacji bez pary wodnej i 198 do 199 ml destylatu w przypadku destylacji z parą wodną. Następnie destylat uzupełnia się wodą destylowaną do 200 ml, przy czym temperatura destylatu nie może odbiegać od temperatury początkowej o więcej niż ± 2 °C.

Bardzo ostrożnie miesza się destylat w kolbie kolistymi ruchami.

Dla win zawierających szczególnie duże ilości jonów amonowych destylat poddaje się powtórnej destylacji, zastępując zawiesinę wodorotlenku wapnia 1-molowym roztworem kwasu siarkowego, rozcieńczonego w stosunku 10:100 (v/v).

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Gęstość (ρ_t) destylatu w temperaturze t °C oznacza się w sposób określony w załączniku nr 1 do rozporządzenia.

5. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Zawartość alkoholu w temperaturze 20 °C odczytuje się przy użyciu tabel alkoholometrycznych.

6. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania zawartości alkoholu powtarzalność (r) wynosi:

$$r = 0,10 \text{ \% obj.}$$

7. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania zawartości alkoholu odtwarzalność (R) wynosi:

$$R = 0,19 \text{ \% obj.}$$

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI EKSTRAKTU CAŁKOWITEGO (suchej masy ogółem)

Ekstrakt całkowity (sucha masa ogółem) jest to zawartość wszystkich substancji nietlotnych.

Ekstrakt bezcukrowy jest to różnica pomiędzy ekstraktem całkowitym a zawartością cukrów ogółem.

Ekstrakt zredukowany jest to różnica między ekstraktem całkowitym a zawartością cukrów ogółem w ilości powyżej 1 g/l, zawartością siarczanu potasowego w ilości powyżej 1 g/l, zawartością mannitolu i zawartością innych substancji chemicznych, które mogą być dodawane do wina.

Ekstrakt reszkowy jest to ekstrakt bezcukrowy pomniejszony o kwasowość związaną w przeliczeniu na kwas winowy.

Zawartość ekstraktu wyraża się w g/l z dokładnością do $\pm 0,5$ g.

1. WYKONANIE OZNACZANIA

Zawartość ekstraktu całkowitego oblicza się pośrednio na podstawie ciężaru właściwego moszczu, a dla wina na podstawie ciężaru właściwego wina pozbawionego alkoholu.

Zawartość ekstraktu całkowitego wyrażana jest przez ilość sacharozy, która rozpuszczona w wodzie i sprowadzona do objętości 1 litra da roztwór o ciężarze właściwym takim jak moszcz lub wino pozbawione alkoholu. Ilości te są podane w tabeli załącznika.

2. OBLICZANIE WYNIKU

Ciężar właściwy (d_1) wina pozbawionego alkoholu oblicza się według wzoru:

$$d_1 = d_v - d_a + 1,000,$$

gdzie:

d_v — oznacza ciężar właściwy wina w temperaturze 20 °C (z poprawką na kwasowość lotną),

$d_v = d_{20}^{20}$ — 0,0000086 kwasowości lotnej wyrażonej w miligramorównoważnikach na litr,

d_a — oznacza ciężar właściwy w temperaturze 20 °C mieszaniny wodno-alkoholowej o tej samej zawartości alkoholu co wino.

d_v obliczać można również na podstawie gęstości w temperaturze 20 °C wina (ρ_v) i mieszaniny wodno-alkoholowej (ρ_a) o tej samej zawartości alkoholu według wzoru:

$$d_v = 1,0018 (\rho_v - \rho_a) + 1,000,$$

gdzie współczynnik 1,0018 zaokrągla się do jedności, gdy wartość ρ_v jest mniejsza od 1,05, co ma miejsce w większości przypadków.

Do obliczenia zawartości ekstraktu całkowitego w g/l na podstawie ciężaru właściwego d_1 wina pozbawionego alkoholu lub na podstawie ciężaru właściwego d_{20}^{20} moszczu stosuje się wartości z tabeli załącznika.

Zawartość ekstraktu całkowitego ustala się w g/l z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

TABELA

Obliczanie zawartości ekstraktu całkowitego w g/l

| Ciężar właściwy z dokładnością do drugiego miejsca po przecinku | Trzecie miejsce po przecinku wartości ciężaru właściwego | | | | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Gramy ekstraktu na litr | | | | | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1,00 | 0,0 | 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 | 206,4 | 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 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | Czwarte miejsce po przecinku wartości ciężaru właściwego | | | | | | | | | |
| | Gramy ekstraktu na litr, które należy dodać | | | | | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| | — | 0,3 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 1,3 | 1,6 | 1,8 | 2,1 | 2,3 |

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CUKRÓW REDUKUJĄCYCH

Cukry redukujące są to wszystkie cukry zawierające wolne grupy karbonylowe, które mogą redukować sole miedziowe w roztworach alkalicznych.

Metoda oznaczania cukrów redukujących polega na przesączeniu zubożonego oraz pozbawionego alkoholu wina lub moszczu przez kolumnę jonowymienną, w której aniony analizowanej próbki są wymieniane na jony octanowe. Przesączoną próbkę klaruje się obojętnym octanem ołowiowym i tak sklarowane wino lub moszcz reaguje z określoną ilością zasadowego roztworu soli miedziowej, a pozostałe w roztworze jony miedziowe są oznaczane jodometrycznie.

| Próbka | Zawartość cukrów (g/l) | Gęstość | Rozcieńczenie (%) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------|-------------------|
| Moszcze i mistele | >125 | >1,038 | 1 |
| Wina słodkie o zawartości cukrów znacznie powyżej 33 g/l, wzmocnione lub niewzmocnione | 25 do 125 | 1,005 do 1,038 | 4 |
| Wina o zawartości cukrów nieco powyżej 33 g/l | 5 do 25 | 0,997 do 1,005 | 20 |
| Wina o zawartości cukrów poniżej 33 g/l | <5 | <0,997 | nierozcieńczane |

Odczynniki:

- 1) jednomolowy roztwór kwasu solnego (HCl);
- 2) jednomolowy roztwór wodorotlenku sodowego (NaOH);
- 3) czteromolowy roztwór kwasu octowego (CH₃COOH);
- 4) dwumolowy roztwór wodorotlenku sodowego (NaOH);
- 5) żywica anionowymienna (Dowex 3 20—50 mesh) lub inna żywica o podobnych własnościach;
- 6) obojętny roztwór octanu ołowiowego, sporządzony z 250 g obojętnego octanu ołowiowego [Pb(CH₃COOH)₂ · 3 H₂O] rozpuszczonego w gorącej wodzie, w takiej ilości, aby można było uzyskać 500 ml gotowego roztworu;
- 7) węgiel wapniowy (CaCO₃).

Klarowanie win o zawartości cukrów poniżej 33 g/l

Do zlewki o średnicy od 10 do 12 cm wlewa się 50 ml wina, a następnie dodaje się 1/2 (n – 0,5) ml roztworu wodorotlenku sodowego (gdzie n oznacza objętość roztworu wodorotlenku sodowego zużytego do oznaczania kwasowości ogólnej w 10 ml wina). Próbkę odparowuje się na wrzącej łaźni wodnej w strumieniu gorącego powietrza do otrzymania objętości około 20 ml. Następnie próbkę przesącza się przez kolumnę z żywicą anionowymienną w formie octanowej, z szybkością 3 ml na dwie minuty. Eluat zbiera się w kolbie miarowej na 100 ml. Naczynie i kolumnę przemywa się sześciokrotnie porcjami wody o objętości 10 ml każda. Następnie, mieszając cały czas, do eluatu dodaje się 2,5 ml nasyconego roztworu octanu ołowiowego oraz 0,5 g węgla wapniowego. Całość cieczy wstrząsa się

1. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO ANALIZY — KLAROWANIE

Przy oznaczaniu cukrów redukujących próbkę rozcieńcza się tak, aby zawartość cukrów w badanym roztworze mieściła się w granicach od 0,5 do 5 g/l.

Win o zawartości cukrów poniżej 33 g/l nie rozcieńcza się w trakcie klarowania, natomiast wina słodkie rozcieńcza się w trakcie klarowania tak, aby zawartość cukrów mieściła się w następujących granicach:

kilkakrotnie i pozostawia na co najmniej 15 minut. Następnie uzupełnia się wodą i przesącza się. 1 ml przesącza odpowiada 0,5 ml wina.

Klarowanie moszczy, misteli, win słodkich i półsłodkich:

- 1) dla moszczy i misteli — przygotowuje się 10 % roztwór badanej próbki, a do analizy bierze się 10 ml rozcieńczonej próbki;
- 2) dla win słodkich o gęstości w temperaturze 20 °C pomiędzy 1,005 i 1,038 — przygotowuje się 20 % roztwór badanej próbki, a do analizy bierze się 20 ml rozcieńczonej próbki;
- 3) dla win półsłodkich o gęstości w temperaturze 20 °C pomiędzy 0,997 i 1,005 — do analizy pobiera się 20 ml nierozcieńczonego wina.

Próbki przesącza się przez kolumnę anionowymienną w formie octanowej z szybkością 3 ml na dwie minuty. Eluat zbiera się w kolbie miarowej na 100 ml. Następnie kolumnę przemywa się wodą aż do uzyskania około 90 ml eluatu. Do eluatu dodaje się 0,5 g węgla wapniowego i 1 ml nasyconego roztworu octanu ołowiowego. Całość miesza się i pozostawia na 15 minut, mieszając od czasu do czasu, po czym uzupełnia wodą do 100 ml i przesącza.

2. WYKONANIE OZNACZANIA*Odczynniki:*

- 1) zasadowy roztwór soli miedziowej — 25 g siarczanu miedziowego (CuSO₄ · 5 H₂O) rozpuszcza się w 100 ml wody, 50 g kwasu cytrynowego (C₆H₈O₇ · H₂O) rozpuszcza się w 300 ml wody, 388 g krystalicznego węgla sodu (Na₂CO₃ · 10 H₂O) rozpuszcza się w 300 ÷ 400 ml gorącej wody, następnie miesza się

roztwory kwasu cytrynowego i węglaanu sodu, dodaje roztwór siarczanu miedzi i dopełnia wodą do 1 litra;

- 2) 30 % roztwór jodku potasowego;
- 3) 25 % kwas siarkowy;
- 4) roztwór skrobi o stężeniu 5 g/l:
wodę w ilości około 500 ml z dodatkiem 5 g skrobi doprowadza się do wrzenia, stale mieszając, a następnie gotuje przez 10 minut, po czym dodaje się 200 g chloru sodu, chłodzi i uzupełnia wodą do 1 litra;
- 5) 0,1-molowy roztwór tiosiarczanu(VI)sodu;
- 6) roztwór cukru inwertowanego o stężeniu 5 g/l:

roztwór sporządza się w następujący sposób: w kolbie miarowej o pojemności 200 ml umieszcza się 4,75 g czystej i suchej sacharozy, dodaje 100 ml wody oraz 5 ml stężonego kwasu solnego (o gęstości $\rho_{20} = 1,16-1,19$ g/ml); kolbę ogrzewa się w łaźni wodnej o temperaturze 60 °C do uzyskania temperatury roztworu 50 °C. Temperaturę tę utrzymuje się przez około 15 minut, a następnie kolbę pozostawia się do ostygnięcia na około 30 minut; roztwór z kolby przenosi się do kolby miarowej o pojemności 1 litra i dopełnia wodą do 1 litra.

Tak sporządzony roztwór może być stosowany nie dłużej niż miesiąc od dnia sporządzenia. Przed użyciem roztwór zobojętnia się roztworem wodorotlenku sodu.

Oznaczenie

W kolbie stożkowej o pojemności 300 ml sporządza się mieszaninę 25 ml zasadowego roztworu siarczanu miedzi z 15 ml wody i 10 ml sklarowanego roztworu badanej próbki. Do tej mieszaniny wrzuca się kilka małych odłamków pumeksu. Następnie na kolbę zakłada się chłodnicę zwrotną. Roztwór podgrzewa się i doprowadza do wrzenia w ciągu 2 minut. Roztwór gotuje się przez 10 minut, po czym kolbę szybko ochładza się w strumieniu zimnej wody. Do ochłodzonego roztworu dodaje się 10 ml roztworu jodku potasu, 25 ml kwasu siarkowego oraz 2 ml roztworu skrobi. Roztwór ten miareczkuje się roztworem tiosiarczanu(VI)sodu. Dla porównania wykonuje się próbę ślepą, w której 10 ml roztworu cukru zastępuje się 10 ml wody destylowanej.

3. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Ilość cukrów zawarta w próbce w przeliczeniu na cukier inwertowany podana w tabeli jest funkcją ilości ($n' - n$) ml zużytego tiosiarczanu sodu,

gdzie n — oznacza ilość ml zużytego tiosiarczanu sodu,
 n' — oznacza ilość ml tiosiarczanu sodu zużytego w próbce ślepej.

Zawartość cukrów w winie, w przeliczeniu na cukier inwertowany, podaje się w g/l z dokładnością do jednego miejsca po przecinku. Uwzględnia się rozcieńczenie próbki powstałe w trakcie klarowania oraz objętość badanej próbki.

4. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania zawartości cukrów redukujących powtarzalność (r) wynosi:

$$r = 0,015 x_i,$$

gdzie x_i oznacza zawartość cukru inwertowanego w g/l próbki.

5. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania zawartości cukrów redukujących odtwarzalność (R) wynosi:

$$R = 0,058 x_i,$$

gdzie x_i oznacza zawartość cukru inwertowanego w g/l próbki.

TABELA

| Zależność między objętością 0,1-molowego roztworu tiosiarczanu sodu ($n' - n$) a ilością cukrów redukujących w mg | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------|----------------------------------------|-----------------------|---------|
| $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml) | Cukry redukujące (mg) | Różnica | $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml) | Cukry redukujące (mg) | Różnica |
| 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 | | | |

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SACHAROZY

Oznaczanie zawartości sacharozy wykonuje się metodą chromatografii cienkowarstwowej, chromatografii cieczowej lub chromatografii gazowej.

METODA CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

W chromatografii cienkowarstwowej sacharozę oddziela się od innych cukrów na płytce pokrytej celulozą. Wywoływanie chromatogramu wykonuje się z zastosowaniem mieszaniny mocznika i kwasu solnego, w temperaturze 105 °C.

Aparatura i sprzęt:

- 1) płytki chromatograficzne pokryte warstwą celulozy o odpowiedniej grubości (20 x 20);
- 2) komora chromatograficzna;
- 3) mikrostrzykawka lub mikropipeta;
- 4) suszarka umożliwiająca uzyskanie temperatury 105 °C, z dokładnością do 2 °C.

Odczynniki:

- 1) węgiel aktywowany do odbarwiania;
- 2) faza ruchoma: dwuchlorometan : kwas octowy 100 % (lodosowy o gęstości $\rho_{20} = 1,05$ g/ml) : etanol : metanol : woda, w następujących proporcjach 50:25:9:6:10;
- 3) roztwór wywołujący sporządzony z: 5 g mocznika, 20 ml dwumolowego kwasu solnego i 100 ml etanolu;
- 4) roztwór wzorcowy zawierający: 35 g glukozy, 35 g fruktozy i 0,5 g sacharozy w 1000 ml wody.

Przygotowanie próbki do analizy

Silnie zabarwiony moszcz lub wino przed wykonaniem oznaczania odbarwia się za pomocą węgla aktywnego.

Otrzymywanie chromatogramu

Na linii równoległej do dolnej krawędzi płytki i oddalonej od niej o 2,5 cm nanosi się:

- 1) 10 μ l próbki;
- 2) 10 μ l roztworu wzorcowego.

Płytkę umieszcza się w komorze uprzednio nasyconej parami fazy ruchomej. Chromatogram rozwija się do momentu, gdy faza ruchoma znajdzie się 1 cm od górnej krawędzi płytki. Płytkę wyjmuje się i suszy w strumieniu ciepłego powietrza. Rozwijanie chromatogramu powtarza się dwukrotnie. Po rozwinięciu chromatogramu płytkę spryskuje się równomiernie 15 ml odczynnika barwiącego i umieszcza w suszarce o temperaturze 105 °C na około 5 minut.

Sacharoza i fruktoza są widoczne w postaci ciemnoniebieskiej plamy na białym tle, a glukoza — w postaci plamy zielonej o mniej intensywnym zabarwieniu.

METODA WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Sacharozę rozdziela się w kolumnie z zastosowaniem wypełnienia na bazie krzemionki z alkiloaminą ja-

ko fazą związaną oraz z detekcją refraktometryczną. Oznaczanie ilościowe jest wykonywane z użyciem wzorca zewnętrznego analizowanego w identycznych warunkach.

Aparatura i sprzęt:

- 1) wysokosprawny chromatograf cieczowy wyposażony w:
 - a) injektor typu zaworu z 10 μ l loop injector,
 - b) detektor, refraktometr różnicowy lub refraktometr interferometryczny,
 - c) kolumnę z wypełnieniem na bazie krzemionki z alkiloaminą jako fazą związaną (długość 25 cm, średnica wewnętrzna 4 mm),
 - d) kolumnę wstępną wypełnioną tą samą fazą,
 - e) izolację prekolumny i kolumny analitycznej, umożliwiającą utrzymanie ich w odpowiedniej temperaturze (30 °C),
 - f) regulację przepływu fazy ruchomej na 1 ml/minutę,
 - g) rejestrator oraz ewentualnie integrator;
- 2) urządzenie do filtracji membranowej (0,45 μ m).

Odczynniki:

- 1) woda redestylowana;
- 2) acetonitryl (CH₃CN) do HPLC;
- 3) faza ruchoma: acetonitryl : woda w proporcji 80:20, poddane uprzednio filtracji membranowej (filtr 0,45 μ m). Fazę ruchomą odgazowuje się przed użyciem;
- 4) roztwór wzorcowy: wodny roztwór sacharozy o stężeniu 1,2 g/l, przesączony przez filtr membranowy 0,45 μ m.

Wykonanie oznaczania

W celu przygotowania próbki wina i moszczu przesącza się przez filtr membranowy 0,45 μ m.

Oznaczanie chromatograficzne wykonuje się, nasykując na kolumnę chromatografu kolejno 10 μ l roztworu wzorcowego i 10 μ l próbki. Zabieg ten powtarza się i rejestruje się chromatogram. Czas retencji sacharozy wynosi około 10 minut.

Obliczanie wyniku oznaczania

Do obliczeń stosuje się średnią obliczoną z dwóch oznaczeń wykonanych dla roztworu wzorcowego i dla próbki. W przypadku win i moszczu wynik oznaczania jest zarazem zawartością sacharozy.

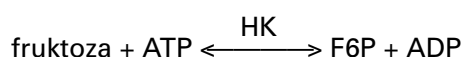
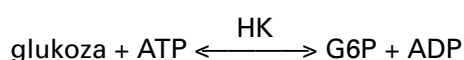
Wyrażanie wyniku

Zawartość sacharozy w winach, moszczach podaje się w g/l wina lub moszczu z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

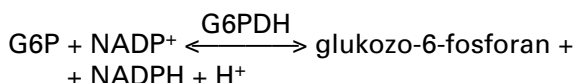
OZNACZANIE ZAWARTOŚCI GLUKOZY I FRUKTOZY

Glukoza i fruktoza są oznaczane indywidualnie metodą enzymatyczną, jedynie w celu obliczenia stosunku glukozy do fruktozy.

Oznaczanie to polega na poddaniu tych cukrów fosforylacji za pomocą adenozynotrójfosforanu (ATP) w wyniku reakcji enzymatycznej katalizowanej przez heksokinazę (HK), podczas której powstają glukozo-6-fosforan (G6P) i fruktozo-6-fosforan (F6P).

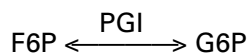


Glukozo-6-fosforan jest początkowo utleniany do 6-fosforanu glukonianu za pomocą fosforanu dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego w obecności enzymu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (G6PDH). Ilość powstającego zredukowanego fosforanu dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) odpowiada ilości glukozy-6-fosforanu, a przez to ilości glukozy.



Zredukowany fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego jest oznaczany przez pomiar absorbancji przy długości fali 340 nm.

Na koniec reakcji fruktozo-6-fosforan przeprowadzany jest w glukozy-6-fosforan za pomocą izomerazy glukofosforanowej (PGI):



Glukozy-6-fosforan reaguje z kolei z fosforanem dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego, dając 6-fosforan glukonianu i zredukowany fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego; ten ostatni związek jest oznaczany ilościowo.

1. APARATURA I SPRZĘT

Do oznaczania zawartości glukozy i fruktozy stosuje się następujący sprzęt laboratoryjny:

- 1) spektrofotometr umożliwiający pomiar przy długości fali 340 nm. Jeżeli opisany aparat nie jest dostępny, można również wykorzystać spektrofotometr ze źródłem światła o nieciągłym widmie,

umożliwiający pomiar przy długości fali 334 lub 365 nm;

- 2) kuwety szklane o długości drogi optycznej 1 cm lub kuwety jednorazowego użytku;
- 3) pipety do odmierzania roztworów do testów enzymatycznych o pojemności 0,02; 0,05; 0,1 i 0,2 ml.

2. ODCZYNNIKI

- 1) Roztwór 1: roztwór buforowy (0,3-molowa trójetanolamina, pH 7,6, 4×10^{-3} M w Mg^{2+}), który otrzymuje się przez rozpuszczenie 11,2 g chłorowodoru trójetanolaminy $[(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N} \cdot \text{HCl}]$ i 0,2 g siarczanu magnezu $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w 150 ml wody redestylowanej i dodanie około 4 ml 5-molowego roztworu wodorotlenku sodu (NaOH) do uzyskania wartości pH 7,6 oraz uzupełnienie wodą do 200 ml. Roztwór buforowy można przechowywać w temperaturze 4 °C przez cztery tygodnie;
- 2) Roztwór 2: roztwór fosforanu dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (około $11,5 \times 10^{-3}$ M), który uzyskuje się przez rozpuszczenie 50 mg fosforanu dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego w 5 ml wody redestylowanej. Roztwór ten może być przechowywany w temperaturze 4 °C przez cztery tygodnie;
- 3) Roztwór 3: trójfosforanu dwusodowego adenozy (około 81×10^{-3} M), który uzyskuje się przez rozpuszczenie 250 mg 5'-trójfosforanu dwusodowego adenozy i 250 mg wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) w 5 ml wody redestylowanej. Roztwór ten może być przechowywany w temperaturze 4 °C przez cztery tygodnie;
- 4) Roztwór 4: heksokinaza/dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu, który uzyskuje się przez zmieszanie 0,5 ml roztworu heksokinazy (2 mg białka/ml lub 280 U/ml) z 0,5 ml roztworu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (1 mg białka/ml). Roztwór ten może być przechowywany w temperaturze około +4 °C przez rok;
- 5) Roztwór 5: izomeraza fosforoglukozowa (2 mg białka/ml lub 700 U/ml), który stosuje się bez rozcieńczania. Roztwór ten może być przechowywany w temperaturze około 4 °C przez rok.

Roztwory przed przystąpieniem do wykonania oznaczania sprowadza się do temperatury 20 °C.

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO ANALIZY

Zależnie od spodziewanej łącznej ilości glukozy i fruktozy w 1 litrze próbki rozcieńcza się, stosując:

| Pomiar przy 340 lub 334 nm | Pomiar przy 365 nm | Rozcieńczanie wodą | Współczynnik rozcieńczenia F |
|----------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| do 0,4 g/l | 0,8 g/l | — | — |
| do 4,0 g/l | 8,0 g/l | 1 + 9 | 10 |
| do 10,0 g/l | 20,0 g/l | 1 + 24 | 25 |
| do 20,0 g/l | 40,0 g/l | 1 + 49 | 50 |
| do 40,0 g/l | 80,0 g/l | 1 + 99 | 100 |
| Powyżej 40,0 g/l | 80,0 g/l | 1 + 999 | 1000 |

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Długość fali w spektrofotometrze ustawia się na 340 nm i przeprowadza pomiar w stosunku do powietrza (bez kuwety na drodze optycznej) lub w stosunku do wody jako odnośnika.

Pomiaru dokonuje się w temperaturze od 20 do 25 °C.

Do kuwet o długości drogi optycznej 1 cm należa się:

| | Kuweta odniesienia | Kuweta z próbka |
|-------------------------|--------------------|-----------------|
| Roztwór 1 | 2,50 ml | 2,50 ml |
| Roztwór 2 | 0,10 ml | 0,10 ml |
| Roztwór 3 | 0,10 ml | 0,10 ml |
| Badana próbka | | 0,20 ml |
| Woda redestylowana | 0,20 ml | |
| Przygotowuje się także: | | |
| Roztwór 4 | 0,02 ml | 0,02 ml |
| Roztwór 5 | 0,02 ml | 0,02 ml |

Roztwory 1, 2 i 3 miesza się. Po około 3 minutach odczytuje ich absorbancję (A_1) i zapoczątkowuje się reakcję enzymatyczną przez dodanie Roztworu 4. Całość miesza się, a następnie po upływie 15 minut odczytuje się absorbancję (A_2). Po następnych 2 minutach sprawdza się, czy reakcja już całkowicie ustała. Wówczas dodaje się Roztwór 5. Ponownie całość miesza się i po upływie 10 minut odczytuje się absorbancję (A_3). Po kolejnych 2 minutach sprawdza się, czy reakcja ustała. Z uwagi na to, że czas trwania reakcji enzymatycznej może być różny dla poszczególnych serii oznaczeń, podany czas należy traktować jako czas przykładowy trwania reakcji dla każdej z serii.

5. OBLICZANIE WYNIKÓW OZNACZANIA

Po zakończeniu analizy oblicza się różnice absorbancji dla kuwet z próbka odniesienia i próbka badaną:

- 1) odpowiadającą zawartości glukozy $A_2 - A_1$;
- 2) odpowiadającą zawartości fruktozy $A_3 - A_2$.

Oblicza się różnicę absorbancji dla kuwety z próbka odniesienia (ΔA_R) i kuwety z badaną próbka (ΔA_S), otrzymując wartości dla:

$$1) \text{ glukozy: } \Delta A_G = (A_2 - A_1)_S - (A_3 - A_2)_R;$$

$$2) \text{ fruktozy: } \Delta A_F = (A_2 - A_1)_S - (A_3 - A_2)_R.$$

Obliczanie zawartości glukozy i fruktozy (C) wykonuje się według wzoru:

$$C \text{ (g/l)} = \frac{V \cdot M}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \Delta A,$$

gdzie:

- V — oznacza objętość roztworu wzorcowego (ml),
- v — oznacza objętość badanej próbki (ml),
- M — oznacza masę cząsteczkową oznaczanej substancji,
- d — oznacza grubość warstwy kuwety o długości drogi optycznej 1 cm,
- ϵ — jest współczynnikiem absorbancji NADPH (przy 340 nm = $6,3 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \text{ cm}^{-1}$).

Dla oznaczania glukozy $V = 2,92$, a dla oznaczania fruktozy $V = 2,94$

$$v = 0,20 \text{ ml}$$

$$M = 180$$

$$d = 1$$

Wykorzystując dane, otrzymuje się dla:

$$1) \text{ glukozy } C(\text{g/l}) = 0,417 \Delta A_G;$$

$$2) \text{ fruktozy } C(\text{g/l}) = 0,420 \Delta A_F.$$

Jeżeli próbka została rozcieńczona w trakcie przygotowywania, wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

Jeżeli pomiar był wykonywany przy długości fali 334 lub 365 nm, uzyskuje się następujące pomiary:

$$1) \text{ przy długości fali } 334 \text{ nm } \epsilon = 6,2 \text{ (mmol}^{-1} \times 1 \text{ cm}^{-1})$$

$$\text{dla glukozy — } C(\text{g/l}) = 0,425 \Delta A_G,$$

$$\text{dla fruktozy — } C(\text{g/l}) = 0,428 \Delta A_F;$$

$$2) \text{ przy długości fali } 365 \text{ nm } \epsilon = 3,4 \text{ (mmol}^{-1} \times 1 \text{ cm}^{-1})$$

$$\text{dla glukozy — } C(\text{g/l}) = 0,773 \Delta A_G,$$

$$\text{dla fruktozy — } C(\text{g/l}) = 0,778 \Delta A_F.$$

6. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania zawartości glukozy i fruktozy powtarzalność (r) wynosi:

$$r = 0,056 x_i,$$

gdzie x_i = zawartość glukozy lub fruktozy w g/l.

7. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania zawartości glukozy i fruktozy odtwarzalność (R) wynosi:

$$R = 0,12 + 0,076 x_i,$$

gdzie x_i = zawartość glukozy lub fruktozy w g/l.

Załącznik nr 8

WYKRYWANIE WZBOGACANIA MOSZCZY GRONOWYCH, ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZY GRONOWYCH I WIN METODĄ MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO DEUTERU (SNIF-NMR/RMN-FINS)

Deuter występujący w cukrach i w wodzie moszczy gronowych po fermentacji znajduje się w winie w cząsteczkach związków oznaczonych jako związki chemiczne:

- I. $\text{CH}_2\text{D CH}_2\text{OH}$
- II. $\text{CH}_3 \text{CHD OH}$
- III. $\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{OD}$
- IV. HOD

Dodatek egzogenego cukru podczas dostadzenia na sucho przed fermentacją moszczu wpływa na rozkład deuteru w cząsteczkach tych związków.

W porównaniu z wartością parametrów dla naturalnego wina kontrolnego z tego samego regionu wzbogacanie egzogenym cukrem będzie powodowało następujące zmiany:

| Wino\Parametry | $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ | $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ | $(\text{D}/\text{H})_{\text{w}}^{\circ}$ | R |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|---|
| - Naturalne | → | → | → | → |
| - Wzbogacane: | | | | |
| - cukrem buraczanym | ↘ | ↘ | ↘ | ↘ |
| - cukrem trzcinowym | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ |
| - cukrem kukurydzianym | | | | |

gdzie:

- D — oznacza deuter,
H — oznacza wodór,
R — oznacza względny rozkład deuteru,
 $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ — oznacza stosunek izotopów w cząsteczkach związku chemicznego I,
 $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ — oznacza stosunek izotopów w cząsteczkach związku chemicznego II,
 $(\text{D}/\text{H})_{\text{w}}^{\circ}$ — oznacza stosunek izotopów w cząsteczkach wody w winie.

$R = 2(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}/(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ wyraża względny rozkład deuteru w cząsteczkach związku chemicznego I i II i jest bezpośrednio mierzony na podstawie natężenia (h) sygnału, stąd R wynosi $3h_{\text{II}}/h_{\text{I}}$.

Parametr $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ charakteryzuje głównie rośliny, które syntetyzują cukier, w mniejszym stopniu położenie geograficzne miejsca uprawy (rodzaj wody wykorzystywanej w fotosyntezie).

Parametr $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ charakteryzuje warunki klimatyczne miejsca uprawy winogron (rodzaj wody deszczowej

i warunki pogodowe) oraz, w mniejszym stopniu, za wartość cukru w wyjściowym moszczu.

Parametr $(D/H)_w^o$ charakteryzuje warunki klimatyczne miejsca uprawy i zawartość cukru w moszczu.

Zdefiniowane parametry $[R, (D/H)_I, \text{ oraz } (D/H)_{II}]$ są oznaczane metodą magnetycznego rezonansu jądrowego deuteru w etanolu wydzielonym z wina lub z produktów fermentacji moszczu, moszczu zagęszczonego uzyskanego w określonych warunkach; parametry te mogą być uzupełnione przez oznaczenie stosunku izotopów w wodzie wydzielonej z wina, $(D/H)_w^o$ oraz przez oznaczenie stosunku izotopów $^{13}C/^{12}C$ w etanolu.

1. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO ANALIZY

Wydzielanie etanolu i wody z wina

Do wydzielenia etanolu i wody z wina dopuszcza się zastosowanie dowolnej metody wydzielenia etanolu, pod warunkiem że metoda taka zapewnia w destylacie, zawierającym 92 do 93 % wagowo etanolu (95 % obj.), uzyskanie odzysku od 98 do 98,5 % całkowitej zawartości etanolu w winie.

Aparatura i sprzęt

Aparat destylacyjny do wydzielenia etanolu, przedstawiony na schemacie, składa się z:

- 1) elektrycznego płaszcza grzejnego z transformatorem;
- 2) kolby okrągłodennej o pojemności 1 litra, ze szlifem;
- 3) kolumny Cadiota z obracającym się pierścieniem (części ruchome wykonane z teflonu);
- 4) kolby stożkowej na 125 ml, ze szlifem;
- 5) butelek o pojemności 125 i 60 ml, z korkami z tworzywa sztucznego.

Odczynniki

Stosuje się odczynniki do oznaczania zawartości wody metodą Karla-Fischera.

Wykonanie oznaczania

W badanej próbce wina oznacza się zawartość etanolu (p) z dokładnością co najmniej 0,05 % obj. zgodnie z metodą opisaną w załączniku nr 3.

Następnie 500 ml jednorodnej próbki wina o zawartości alkoholu (p) wprowadza się do kolby aparatu destylacyjnego o stałej wartości stopnia deflegmacji równej 0,9. Jako odbieralnik destylatu umieszcza się kolbę stożkową na 125 ml. Destylat zbiera się w ilości około 40 do 60 ml, przy temperaturze wrzenia między 78,0 a 78,2 °C. Jeżeli temperatura przekroczy 78,5 °C przerywa się zbieranie destylatu na 5 minut.

Gdy temperatura ponownie osiągnie 78 °C, zbiera się ponownie destylat do osiągnięcia temperatury 78,5 °C. Czynność tę powtarza się do chwili, gdy temperatura, po przerywaniu destylacji i pracy w obiegu zamkniętym, utrzyma się na stałym poziomie. Całkowita destylacja trwa około 5 godzin. Metoda ta pozwala na odzyskanie w destylacie od 98 do 98,5 % całości zawartego w winie alkoholu, przy czym zawartość alkoholu w destylacie wynosi od 92 do 93 % wagowo (95 % obj.) i jest to stężenie, dla którego ustalono warunki NMR.

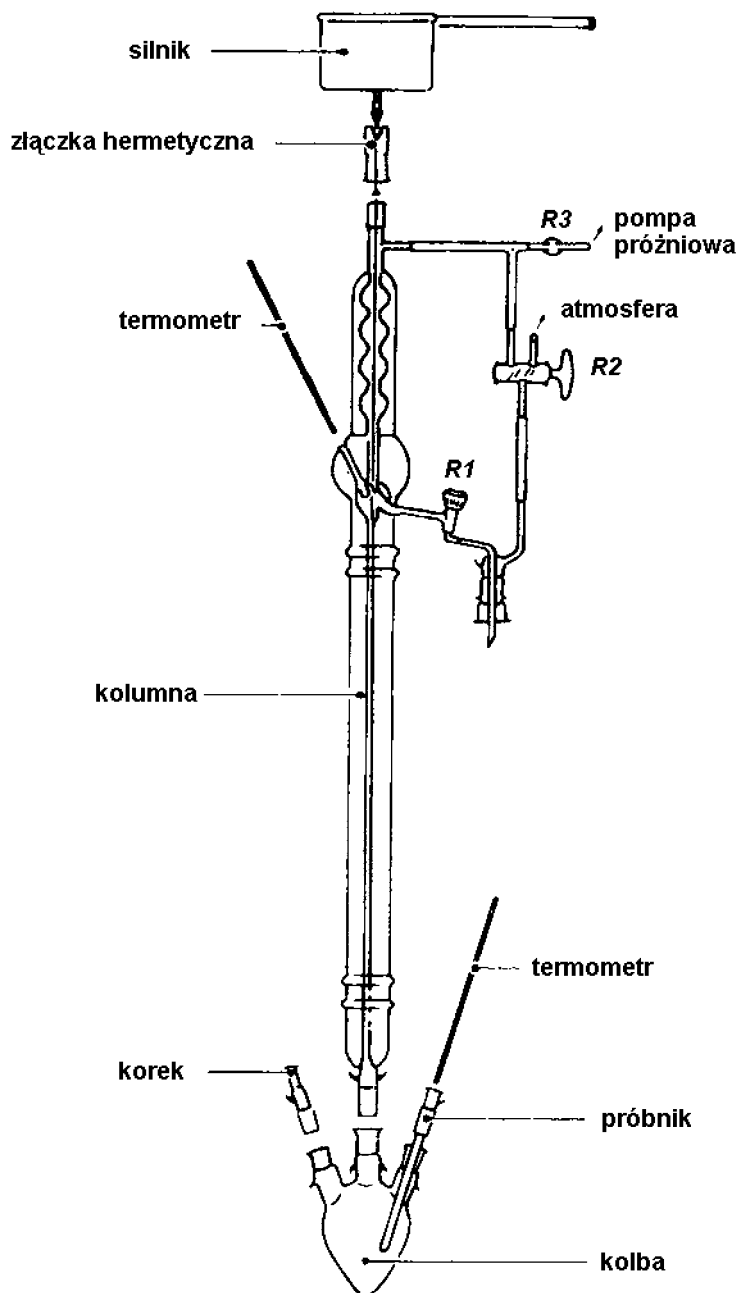
Następnie waży się zebrany destylat, po czym 60 ml jednorodnej próbki pozostałości po destylacji, odpowiadającej wodzie zawartej w winie, przenosi się do kolby na 60 ml.

W próbce tej można oznaczyć stosunek izotopów.

Jeżeli do oznaczania stosuje się spektrometr wyposażony w próbnik o średnicy 10 mm, do oznaczenia wystarczy jednorodna próbka wina o objętości 300 ml.

Zawartość wody (p') w gramach oznacza się metodą Karla-Fischera.

Schemat aparatu destylacyjnego do wydzielania etanolu



Zawartość alkoholu (t_m^D) w % wagowych oblicza się według wzoru:

$$t_m^D = \frac{p-p'}{p} \times 100.$$

Fermentacja moszczy i moszczy zagęszczonych

Odczynniki:

- 1) kwas winowy;
- 2) DIFCO — drożdże bez aminokwasów (Bacto Yeast Nitrogen Base);

- 3) aktywne suszone drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*), przy czym jeżeli znany jest stosunek izotopów w moszczu, drożdże suszone przed użyciem mogą być uaktywniane przez 15 minut w minimalnej ilości letniej niedestylowanej wody, aby stosunek izotopów był podobny do stosunku izotopów w moszczu. Jeżeli stosunek izotopów w moszczu nie jest znany, lepiej użyć świeżych drożdży.

Aparatura

Naczynie fermentacyjne o pojemności 1,5 l wyposażone w urządzenie zapewniające hermetyczne zamknięcie i skraplanie par alkoholu, ponieważ w trakcie

fermentacji nie mogą wystąpić żadne straty etanolu. Wydajność przemiany cukrów fermentujących w etanol powinna wynosić ponad 98 %.

Wykonanie oznaczania:

- 1) moszcze świeże, w których uprzednio oznaczono zawartość cukrów fermentujących — 1 litr moszczu umieszcza się w naczyniu fermentacyjnym. Do naczynia dodaje się jeden gram suchych, wcześniej uaktywnionych drożdży, po czym zamyka się szczelnie naczynie. Fermentację prowadzi się w temperaturze około 20 °C do czasu zużycia cukrów. Po oznaczeniu mocy alkoholowej w produkcie fermentacji i obliczeniu wydajności przemiany cukrów w etanol odwirowuje się przefermentowaną ciecz i oddestylowuje etanol;
- 2) moszcze z fermentacją zatrzymaną przez dodanie dwutlenku siarki; wykonuje się desulfitację około 1,2 litra tego moszczu przez przepuszczenie azotu przez moszcz umieszczony w łaźni wodnej o temperaturze 70 do 80 °C pod chłodnicą zwrotną, do uzyskania zawartości dwutlenku siarki mniej niż 200 mg/l. Zwraca się uwagę, aby moszcz nie uległ zagęszczeniu w wyniku odparowania wody; w tym celu stosuje się wydajne chłodzenie. Następnie 1 litr desulfitowanego moszczu umieszcza się w naczyniu fermentacyjnym i postępuje dalej tak jak w przypadku moszczu świeżego. Jeżeli do sulfitacji moszczu użyto pirosiarczynu sodowego, przed desulfitacją do moszczu dodaje się 0,25 ml kwasu siarkowego (o gęstości $\rho_{20} = 1,84$ g/ml) na 1 g pirosiarczynu dodanego na 1 litr moszczu;
- 3) moszcze zagęszczone o znanej zawartości cukrów w ilości odpowiadającej masie około 170 g umieszcza się w naczyniu fermentacyjnym. Następnie uzupełnia się do 1 litra wodą o tym samym stosunku izotopów co próbki naturalnego moszczu, dodaje 1 g suchych drożdży i 3 g DIFCO, po czym dokładnie miesza się i postępuje dalej tak jak w przypadku moszczu świeżego.

Przygotowanie próbki alkoholu do oznaczania metodą NMR

Odczynniki:

- 1) N,N-czterometylomocznik (TMU) — używa się próbki wzorcowego TMU o podanym, kontrolowanym stosunku izotopów D/H;
- 2) heksafluorobenzen.

Wykonanie oznaczania:

- 1) w przypadku zastosowania próbnika do NMR o średnicy 15 mm postępuje się w następujący sposób — do uprzednio zważonej butelki szklanej zbiera się 7 ml alkoholu uzyskanego podczas wydzielania etanolu z wina i waży całość z dokładnością do 0,1 mg (m_A); następnie bierze się 3 ml próbki wzorcowej (TMU) i waży z dokładnością do 0,1 mg (m_{ST}). Całość miesza się, dokładnie wstrząsając;

- 2) w przypadku zastosowania próbnika do NMR o średnicy 10 mm pobiera się 3,2 ml alkoholu i 1,3 ml TMU.

Zależnie od rodzaju spektrometru i próbnika dodaje się odpowiednie ilości heksafluorobenzenu jako substancji stabilizującej częstotliwość pola zgodnie z zamieszczoną tabelą:

| Spektrometr | Próbnik 10 mm | Próbnik 15 mm |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| 7,05 T 9,4 T | 150 μ l 35 μ l | 200 μ l 50 μ l |

Przygotowanie próbki wody do pomiarów metodą NMR, w celu ewentualnego oznaczania w niej stosunku izotopów

Odczynniki

N,N-czterometylomocznik (TMU)

Wykonanie oznaczania

3 ml wody uzyskanej podczas wydzielania etanolu i wody z wina lub podczas fermentacji moszczu umieszcza się w wytarowanej kolbie i waży z dokładnością do 0,1 mg (m'_E). Następnie wprowadza się 4 ml wzorca wewnętrznego (TMU) i waży z dokładnością do 0,1 mg (m'_{ST}), po czym całość miesza się dokładnie przez wstrząsanie.

2. WYKONANIE OZNACZANIA — REJESTROWANIE WIDM ^2H NMR ALKOHOLU I WODY

Oznaczanie parametrów izotopowych

Aparatura i sprzęt

- 1) spektrometr NMR wyposażony w specyficzny próbnik deuterowy dostrojony do charakterystycznej częstotliwości V_0 pola B_0 , posiadający kanał odsprężania protonów (B_2) i kanał stabilizacji częstotliwości pola na częstotliwości fluorowej. Rozdzielczość mierzona w widmie, transformowana bez mnożenia wykładniczego (to jest $LB = 0$) i wyrażana przez szerokość połówkową sygnału metylowego i metylenowego etanolu oraz sygnału metylowego TMU, może być większa lub równa 0,5 Hz. Czułość mierzona ze współczynnikiem mnożenia wykładniczego $LB = 2$ nie może być mniejsza od 150 dla sygnału metylowego etanolu w roztworze o mocy alkoholowej 95 % obj./93,5 % wagowo). W tych warunkach przedział ufności dla pomiaru wysokości sygnału, obliczany z prawdopodobieństwem 97,5 % (test jednostronny) i dla 10 powtórzeń widm, wynosi 0,35 %;
- 2) urządzenie do automatycznej zmiany próbek;
- 3) komputerowy program do obróbki danych;
- 4) próbki na próbki o średnicy 15 lub 10 mm, zależne od konstrukcji spektrometru.

Kalibracja i sprawdzanie prawidłowości kalibracji spektrofotometru

- 1) przeprowadza się zwykłą kalibrację odnośnie do jednorodności i czułości zgodnie z zaleceniami producenta;
- 2) sprawdza się prawidłowość kalibracji.

Używa się wzorcowych etanoli, oznaczonych literami C, V i B, o różnym stężeniu izotopów, ale dokładnie standaryzowanych, gdzie:

- C — oznacza alkohol uzyskany z cukru trzcinowego lub glukozy kukurydzianej,
 V — oznacza alkohol uzyskany z winogron,
 B — oznacza alkohol uzyskany z buraków.

Postępując zgodnie z metodą opisaną dalej, oznacza się stosunek izotopów w alkoholu uzyskanym z cukru trzcinowego lub glukozy kukurydzianej (C_{meas}), alkoholu uzyskanym z winogron (V_{meas}) i alkoholu uzyskanym z buraków (B_{meas}).

Wartości uzyskane z oznaczania porównuje się z wartościami podanymi dla odpowiednich wzorców — alkoholu uzyskanego z cukru trzcinowego lub glukozy kukurydzianej (C_{ST}), alkoholu uzyskanego z winogron (V_{ST}) i alkoholu uzyskanego z buraków (B_{ST}).

Odchylenie standardowe powtarzalności uzyskanej na średniej z 10 powtórzeń każdego widma nie może przekroczyć 0,01 dla współczynnika (R) i 0,3 ppm dla stosunku (D/H)_I oraz (D/H)_{II}.

Warunki uzyskiwania widm NMR

Przygotowaną próbkę alkoholu lub próbkę wody umieszcza się w próbówce szklanej o średnicy 15 lub 10 mm i wprowadza do próbownika.

Warunki uzyskiwania widm NMR są następujące:

- 1) stała temperatura w próbniku;
- 2) czas akwizycji co najmniej 6,8 s dla szerokości widma 1200 Hz (16 K pamięci); (około 20 ppm przy 61,4 MHz lub 27 ppm przy 46,1 MHz);
- 3) impuls 90°;
- 4) ustawienie czasu akwizycji — wartość ta powinna być tego samego rzędu co czas relaksacji;
- 5) detekcja paraboliczna — przesunięcie offsetu 01 ustawić pomiędzy wzorcowym sygnałem OD i CHD dla etanolu i pomiędzy wzorcowym sygnałem HOD i TMU dla wody;
- 6) wartość przesunięcia odsprężania oznacza się na podstawie widma protonowego mierzonego za pomocą cewki odsprężającej w tej samej próbówce. Dobre odsprężanie osiąga się, gdy 02 znajduje się w środku przedziału częstotliwości występującego między grupami CH₃- i CH₂. Stosuje się szerokie pasmo odsprężania.

Dla każdego widma prowadzi się pewną liczbę akumulacji NS, wystarczającą do uzyskania stosunku sygnału do szumu. Powtarza się te akumulacje NE = 10 razy. Wartości NS zależą od rodzaju spektrometru i używanego próbownika.

3. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA**Etanol**

Dla każdego z 10 uzyskanych widm wyznacza się:

$$1) R = \frac{3h_{II}}{h_I} = 3 \times \frac{\text{wysokość sygnału II (CH}_3\text{CHDOH)}}{\text{wysokość sygnału I (CH}_2\text{DCH}_2\text{OH)}};$$

$$2) (D/H)_I = 1,5866 \times T_I \times \frac{m_{st}}{m_A} \times \frac{(D/H)_{st}}{t_m^D};$$

$$3) (D/H)_{II} = 2,3799 \times T_{II} \times \frac{m_{st}}{m_A} \times \frac{(D/H)_{st}}{t_m^D}$$

przy czym:

$$a) T_I = \frac{\text{wysokość sygnału I (CH}_2\text{DCH}_2\text{OH)}}{\text{wysokość sygnału wzorca wewnętrznego (TMU)}},$$

$$b) T_{II} = \frac{\text{wysokość sygnału II (CH}_3\text{CHDOH)}}{\text{wysokość sygnału wzorca wewnętrznego (TMU)}},$$

c) (D/H)_{st} oznacza stosunek izotopów we wzorcu wewnętrznym (TMU).

Wykorzystując do obliczeń wysokość piku uzyskanego na chromatogramie, zamiast jego powierzchni, co jest metodą mniej dokładną, zakłada się, że szerokość piku w połowie jego wysokości jest identyczna i pozwala uzyskać możliwe do przyjęcia przybliżenie.

Woda

Jeżeli stosunek izotopów w wodzie jest oznaczany metodą NMR w mieszaninie woda — TMU, wykorzystuje się następujący wzór:

$$(D/H)_w^o = 0,9306 \times T_{IV} \times \frac{m'_{st}}{m'_E} \times (D/H)_{st}$$

przy czym:

$$1) T_{IV} = \frac{\text{powierzchnia sygnału (HOD) wody wydzielonej z wina}}{\text{powierzchnia sygnału wzorca wewnętrznego (TMU)}},$$

2) (D/H)_{st} oznacza stosunek izotopów we wzorcu wewnętrznym (TMU).

Dla każdego z parametrów izotopów oblicza się średnią z 10 oznaczeń oraz przedział ufności.

4. INTERPRETACJA WYNIKU

Porównuje się wartości względnego rozkładu deuteru w badanej próbce (R^X) z wartością względnego rozkładu deuteru we wzorcu ($R_{I}^{T_1}$) lub ($R_{II}^{T_1}$). Jeżeli R^X różni się od średniej wartości $R_{I}^{T_1}$ lub $R_{II}^{T_1}$ uzyskanej dla wina kontrolnego o więcej niż dwukrotną wartość odchylenia standardowego, można przypuszczać, że próbka została zafaszowana.

Wykrywanie dodatku cukru buraczanego, cukru trzcinowego lub glukozy kukurydzianej

1) Dla wina:

gdy R^X jest większe od $R_{I}^{T_1}$ — przypuszczalnie został dodany cukier buraczany,
gdy R^X jest mniejsze od $R_{II}^{T_1}$ — przypuszczalnie został dodany cukier trzcinowy lub glukoza kukurydziana;

2) Moszcze, moszcze zagęszczone:

Oznacza się wartości parametrów izotopów w alkoholu wydzielonym z fermentowanego produktu otrzymanego podczas fermentacji moszczu lub moszczu zagęszczonego, postępując zgodnie z instrukcją, i porów-

nuje się te wartości z alkoholem wydzielonym z produktu fermentacji moszczy.

Wielkość wzbogacenia E w % obj. wyraża objętość alkoholu dodanego do fermentowanego produktu. Znając rozcieńczenia, które mogły być dokonane przed fermentacją (w przypadku moszczy zagęszczonych), i zakładając, że z 16,83 g cukru otrzymuje się 1 % obj. alkoholu, należy obliczyć ilość (masę) cukru dodanego na litr moszczu, moszczu zagęszczonego.

Wykrywanie dodatku mieszaniny cukru buraczanego, cukru trzcinowego lub glukozy kukurydzianej

Stosunek izotopów $(D/H)_I$ i R zmienia się w mniejszym stopniu w przypadku dodania mieszaniny cukrów niż w przypadku dodania tylko jednego rodzaju cukru.

Wartość $(D/H)_{II}$ jest większa, jak również wartość $(D/H)_w^0$.

Dodanie mieszaniny cukrów można potwierdzić przez wyznaczenie stosunku $^{13}C/^{12}C$ w etanolu metodą spektrometrii masowej, gdyż w przypadku zafaszowania stosunek ten jest wyższy.

Załącznik nr 9

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI POPIOŁU

Popiół stanowią wszystkie substancje pozostające po spaleniu pozostałości po odparowaniu wina. Spalanie przeprowadza się w taki sposób, aby wszystkie kationy (z wyjątkiem kationów amonowych) przeszły w formę węglanów lub innych bezwodnych soli nieorganicznych.

Pozostałość po odparowaniu wina jest spalana w temperaturze od 500 do 550 °C aż do całkowitego spalenia (utlenienia) substancji organicznych.

1. APARATURA I SPRZĘT

- 1) łaźnia z wrzącą wodą;
- 2) waga o czułości do 0,1 mg;
- 3) płyta grzejna lub promiennik w podczerwieni;
- 4) elektryczny piec muflowy o kontrolowanej temperaturze;
- 5) ekcykator;
- 6) tygiel platynowy o średnicy 70 mm i wysokości 25 mm.

2. WYKONANIE OZNACZANIA

Po uprzednim zważeniu tygla z platyny odmierza się 20 ml wina. Próbkę odparowuje się na wrzącej łaźni wodnej, a następnie ogrzewa pozostałość na płycie grzejnej o temperaturze 200 °C lub w promienniku w podczerwieni aż do rozpoczęcia zwęglania próbki. Gdy z próbki przestanie wydzielać się dym, umieszcza

się tygiel w elektrycznym piecu muflowym o temperaturze 525 ± 25 °C. Po 15 minutach zwęglania tygiel wyjmuje się z pieca, dodaje 5 ml wody destylowanej i odparowuje wodę na łaźni wodnej lub w promienniku w podczerwieni, a następnie ponownie ogrzewa w temperaturze 525 °C przez 10 minut.

W sytuacji gdy nie nastąpiło całkowite spalanie zwęglonych cząsteczek, powtarza się przemywanie, odparowywanie wody i prażenie.

W przypadku win o wysokiej zawartości cukrów korzystne jest dodanie do wyciągu, przed pierwszym spopieleniem, kilku kropli czystego oleju roślinnego w celu zapobieżenia nadmiernemu pienieniu próbki.

Po zakończeniu spalania próbki przenosi się do ekcykatora. Po ochłodzeniu w ekcykatorze waży się tygiel.

3. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Zawartość popiołu (P) w badanej próbce, w g/l, oblicza się według wzoru:

$$P = 50 \times (P_1 - P_0),$$

gdzie:

P_0 — oznacza masę pustego tygla,

P_1 — oznacza masę tygla ze spopieloną próbką (popiołem),

50 — oznacza przelicznik 20 ml na litr.

OZNACZANIE ALKALICZNOŚCI POPIOŁU

Alkaliczność popiołu stanowi suma kationów, innych niż kationy amonowe, związanych z kwasami organicznymi w winie.

Metoda oznaczania alkaliczności popiołu polega na rozpuszczeniu popiołu w gorącym roztworze kwasu, a następnie dokonaniu oznaczania nadmiaru kwasu metodą miareczkową z użyciem oranżu metylowego jako wskaźnika.

1. ODCZYNNIKI I APARATURA

- 1) 0,05-molowy roztwór kwasu siarkowego (H_2SO_4);
- 2) 0,1-molowy roztwór wodorotlenku sodu (NaOH);
- 3) 0,1 % wodny roztwór oranżu metylowego;
- 4) wrząca łaźnia wodna.

2. WYKONANIE OZNACZANIA

Do tygla platynowego, w którym został umieszczony popiół otrzymany z 20 ml wina, odmierza się 10 ml roztworu kwasu siarkowego. Tygiel umieszcza się we wrzącej łaźni wodnej na około 15 minut, rozbijając i mieszając zawartość tygla za pomocą szklanej bagietki w celu przyspieszenia rozpuszczania. Następnie dodaje się dwie krople roztworu oranżu metylowego i odmiareczkuje nadmiar kwasu siarkowego roztworem wodorotlenku sodu do zmiany barwy wskaźnika na żółtą.

3. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Alkaliczność popiołu (A) w miligramorównoważnikach na litr, z dokładnością do jednego miejsca po przecinku, oblicza się według wzoru:

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

gdzie n jest objętością roztworu wodorotlenku sodu zużytego do oznaczania.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CHLORKÓW

Zawartość chlorków oznacza się bezpośrednio w winie metodą potencjometryczną z zastosowaniem elektrody Ag/AgCl.

1. APARATURA I SPRZĘT

- 1) pehametr/miliwoltomierz o działce elementarnej co najwyżej 2 mV;
- 2) mieszadło magnetyczne;
- 3) elektroda Ag/AgCl z nasycionym roztworem azotanu sodowego jako elektrolitem;
- 4) mikrobiureta o działce elementarnej 1/100 ml;
- 5) stoper.

2. ODCZYNNIKI

- 1) wzorcowy roztwór chlorku sporządzony przez rozpuszczenie w wodzie destylowanej 2,1027 g chlorku potasu (KCl, maks. 0,005 % Br) wysuszonego przed użyciem przez kilka dni w eksykatorze, a następnie dodaje się wody destylowanej do uzyskania 1 litra roztworu. Sporządzony w ten sposób roztwór w 1 ml zawiera 1 mg Cl;
- 2) roztwór azotanu srebra do miareczkowania sporządzony przez rozpuszczenie w 10 % obj. roztworze alkoholu 4,7912 g azotanu srebra ($AgNO_3$) i uzupełnienie do 1 litra;

w sporządzonym w ten sposób roztworze: 1 ml odpowiada 1 mg Cl;

- 3) kwas azotowy o czystości co najmniej 65 % (o gęstości $\rho_{20} = 1,40$ g/ml).

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Do cylindrycznego naczynia na 150 ml umieszczonego na mieszadle magnetycznym odmierza się 5,0 ml wzorcowego roztworu chlorku, a następnie rozcieńcza się wodą do około 100 ml i zakwasza, dodając 1 ml kwasu azotowego. Po zanurzeniu elektrody miareczkuje się roztworem azotanu srebra dozowanym z mikrobiurety, stosując umiarkowane mieszanie. Początkowo dodaje się azotan w czterech porcjach po 1,0 ml każda, odczytując wartość potencjału w miliwoltach (mV). Następnie dodaje się 2 ml azotanu w porcjach po 0,2 ml i kolejną porcję 1 ml azotanu aż do wprowadzenia całości 10 ml azotanu. Po dokonaniu każdorazowego wkroplenia odczeka się około 30 sekund i odczytuje wartość potencjału. Na podstawie uzyskanych wartości potencjału sporządza się wykres w układzie $P = f(c)$, gdzie P — oznacza wartość potencjału, c — oznacza ilość zużytego roztworu azotanu srebra. Na podstawie punktu przegięcia krzywej odczytuje się potencjał punktu równoważnikowego.

Do cylindrycznego naczynia na 150 ml odmierza się 5 ml wzorcowego roztworu chlorku, dodaje się 95 ml

wody destylowanej i 1 ml kwasu azotowego i zanurza elektrodę. Następnie miareczkuje się roztworem azotanu srebra dozowanym z mikrobiurety, ciągle mieszając, do uzyskania potencjału punktu równoważnikowego. Oznaczenie powtarza się do uzyskania zbliżonych wyników. Test ten należy przeprowadzić przed każdą serią oznaczeń chlorków w próbkach win.

Do cylindrycznego naczynia na 150 ml odmierza się 50 ml wina, następnie dodaje się 50 ml wody destylowanej i 1 ml kwasu azotowego i miareczkuje roztworem azotanu srebra dozowanym z mikrobiurety, ciągle mieszając, do uzyskania potencjału punktu równoważnikowego.

Dla dokładnego oznaczania:

- 1) miareczkuje się roztworem azotanu srebra, dodając po 0,5 ml i rejestrując odczytaną wartość potencjału w mV. Na podstawie pierwszego miareczkowania określa się przybliżoną objętość azotanu srebra potrzebną do zmiareczkowania próbki;
- 2) powtarza się miareczkowanie w tych samych warunkach. Na początku dodaje się po 0,5 ml roztworu miareczkującego do momentu, w którym dodana ilość jest mniejsza od objętości wyznaczonej w pkt 1 i wynosi od 1,5 do 2,0 ml. Następnie dodaje się po 0,2 ml roztworu miareczkującego, po czym kontynuuje się miareczkowanie aż poza wyznaczone w przybliżeniu punkt równoważnikowy w sposób symetryczny, dodając po 0,2 ml, a następnie po 0,5 ml roztworu azotanu srebra.

4. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Zawartość chlorków w badanej próbce wynosi:

$20 \times V$ — wynik wyrażony w mg/l w przeliczeniu na chlor (Cl),

$0,5633 \times V$ — wynik wyrażony w miligramorównoważnikach na litr,

$32,9 \times V$ — wynik wyrażony w mg/l w przeliczeniu na chlorek sodu (NaCl),

gdzie V — oznacza ilość ml azotanu srebra zużytego w oznaczaniu.

Punkt końcowy miareczkowania oraz dokładną objętość zużytego roztworu azotanu srebra określa się:

- 1) przez wykreślenie krzywej i wyznaczenie punktu równoważnikowego lub

2) według wzoru:

$$V = V' + \Delta V_1 \frac{\Delta \Delta E_1}{\Delta \Delta E_1 + \Delta \Delta E_2},$$

gdzie:

V — oznacza ilość ml zużytego roztworu azotanu srebra do uzyskania punktu równoważnikowego,

V' — oznacza ilość ml zużytego roztworu azotanu srebra przed największym skokiem potencjału,

ΔV_1 — oznacza stałą objętość, w jakiej wprowadzono roztwór azotanu srebra, równą 0,2 ml,

$\Delta \Delta E_1$ — oznacza drugą różnicę potencjału przed największym skokiem potencjału,

$\Delta \Delta E_2$ — oznacza drugą różnicę potencjału po największym skoku potencjału.

5. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania zawartości chlorków powtarzalność (r) wynosi:

- 1) $r = 1,2$ mg/l w przeliczeniu na Cl;
- 2) $r = 0,03$ miligramorównoważnika na litr;
- 3) $r = 2,0$ mg/l w przeliczeniu na NaCl.

6. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania zawartości chlorków odtwarzalność (R) wynosi:

- 1) $R = 4,1$ mg/l w przeliczeniu na Cl;
- 2) $R = 0,12$ miligramorównoważnika na litr;
- 3) $R = 6,8$ mg/l w przeliczeniu na NaCl.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SIARCZANÓW

Metoda oznaczania zawartości siarczanów polega na wytrąceniu jonów siarczanowych za pomocą chlorku baru. Równocześnie wytrącający się fosforan baru jest usuwany przez przemywanie osadu kwasem chłorowodorowym. Uzyskany osad po spopieleniu waży się. W przypadku moszczy i win bogatych w dwutlenek siarki przed oznaczaniem zalecana jest desulfatacja przez gotowanie w szczelnie zamkniętym naczyniu.

1. ODCZYNNIKI

- 1) dwumolowy roztwór kwasu solnego;
- 2) roztwór chlorku baru $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, o stężeniu 200 g/l.

2. WYKONANIE OZNACZANIA

Ogólny sposób wykonania oznaczania

Do próbówki do wirowania o pojemności 50 ml odmierza się 40 ml badanej próbki i dodaje 2 ml kwasu solnego i 2 ml roztworu chlorku baru. Całość miesza się mieszadłem szklanym, następnie mieszadło przemywa się niewielką ilością wody destylowanej i odstawia na 5 minut, po czym wiruje 5 minut. Po zakończeniu wirowania ostrożnie zlewa się ciecz znad osadu. Uzyskany osad siarczanu baru przemywa się 10 ml kwasu solnego, następnie wytwarza się zawiesinę i wiruje przez 5 minut, po czym ostrożnie zlewa się ciecz znad osadu. Przemywanie wykonuje się dwukrotnie w tych samych warunkach, za każdym razem używając 15 ml wody destylowanej. Po zakończeniu przemywania osad przenosi się do zważonego naczynka platynowego, wypłukując osad wodą destylowaną. Naczynko wraz z osadem umieszcza się w łaźni wodnej o temperaturze 100 °C aż do całkowitego odparowania. Suchy osad praży się kilkakrotnie w płomieniu do uzyskania białej pozostałości, następnie ochładza w eksykatorze i waży.

Specjalny sposób wykonania oznaczania

Specjalny sposób wykonania oznaczania dotyczy moszczy i win o wysokiej zawartości dwutlenku siarki.

Do kolby stożkowej na 500 ml wyposażonej we wkraplacz i rurkę odprowadzającą odmierza się 25 ml wody i 1 ml czystego kwasu solnego o gęstości (ρ_{20}) wynoszącej od 1,15 do 1,18 g/ml. Roztwór zagotowuje się w celu odpowietrzenia. Następnie przez lejek wprowadza się 100 ml wina. Próbkę gotuje się dalej aż do momentu, gdy objętość cieczy w kolbie zmniejszy się do około 75 ml. Po ochłodzeniu roztwór przenosi się ilościowo do kolby miarowej na 100 ml i uzupełnia wodą do 100 ml. Uzyskuje się w ten sposób próbkę do badań.

Do próbówki do wirowania o pojemności 50 ml odmierza się 40 ml próbki do badań i dodaje 2 ml kwasu

solnego i 2 ml roztworu chlorku baru. Całość miesza się mieszadłem szklanym, następnie mieszadło przemywa się niewielką ilością wody destylowanej i odstawia na 5 minut, po czym wiruje 5 minut. Po zakończeniu wirowania ostrożnie zlewa się ciecz znad osadu. Uzyskany osad siarczanu baru przemywa się 10 ml kwasu solnego, następnie wytwarza się zawiesinę i wiruje przez 5 minut, po czym ostrożnie zlewa się ciecz znad osadu. Przemywanie wykonuje się dwukrotnie w tych samych warunkach, za każdym razem używając 15 ml wody destylowanej. Po zakończeniu przemywania osad przenosi się do zważonego naczynka platynowego, wypłukując osad wodą destylowaną. Naczynko wraz z osadem umieszcza się w łaźni wodnej o temperaturze 100 °C aż do całkowitego odparowania. Suchy osad praży się kilkakrotnie w płomieniu do uzyskania białej pozostałości, następnie ochładza w eksykatorze i waży.

3. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Zawartość siarczanów w mg/l w przeliczeniu na siarczan potasu (K_2SO_4) oblicza się, mnożąc 18,67 przez ilość mg otrzymanego siarczanu baru.

Zawartość siarczanów w moszczach i winie oznacza się w mg chlorku potasu/litr, z dokładnością do 1 mg.

4. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania zawartości siarczanów powtarzalność (r) wynosi:

- 1) do 1000 mg/l: $r = 27 \text{ mg/l}$;
- 2) około 1500 mg/l: $r = 41 \text{ mg/l}$.

5. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania zawartości siarczanów odtwarzalność (R) wynosi:

- 1) do 1000 mg/l: $R = 51 \text{ mg/l}$;
- 2) około 1500 mg/l: $R = 81 \text{ mg/l}$.

OZNACZANIE KWASOWOŚCI OGÓLNEJ

Kwasowość ogólna jest sumą kwasowości miareczkowych próbki, gdy miareczkowanie odbywa się do pH 7 przy użyciu mianowanego roztworu zasady.

Dwutlenek węgla nie wchodzi w skład kwasowości ogólnej.

Metoda oznaczania kwasowości ogólnej polega na miareczkowaniu potencjometrycznym lub miareczkowaniu z błękitem bromotymolowym jako wskaźnikiem i porównaniu z wzorcem o barwie odpowiadającej punktowi końcowemu miareczkowania.

1. ODCZYNNIKI

- 1) roztwór buforowy o pH 7,0 sporządzony z 107,3 g dwuwodorofosforanu potasowego (KH_2PO_4), 500 ml jednomolowego roztworu wodorotlenku sodu (NaOH) i wody w ilości potrzebnej do uzyskania 1000 ml roztworu;
- 2) 0,1-molowy roztwór wodorotlenku sodu (NaOH);
- 3) roztwór wskaźnika błękitu bromotymolowego o stężeniu 4 g/l, sporządzony z: 4 g błękitu bromotymolowego ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_8\text{S}$) rozpuszczonego w 200 ml obojętnego etanolu 96 % obj., 200 ml wody pozbawionej CO_2 , jednomolowego roztworu wodorotlenku sodu w ilości potrzebnej do uzyskania barwy niebieskozielonej (pH 7) — około 7,5 ml i wody w ilości potrzebnej do uzyskania 1000 ml roztworu.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) pompka wodna;
- 2) kolba próżniowa na 500 ml;
- 3) potencjometr skalowany w wartościach pH;
- 4) elektrody szklana i kalomelowa lub kombinowana;
- 5) cylindry miarowe na 50 ml i 100 ml.

Elektrodę szklaną przechowuje się w wodzie destylowanej. Elektrodę kalomelową nasyconą chlorkiem potasu przechowuje się w nasyconym roztworze chloru potasu. Najczęściej jest używana elektroda kombinowana, która powinna być przechowywana w wodzie destylowanej.

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO ANALIZY

Przygotowanie próbki

Do kolby próżniowej odmierza się około 50 ml wina. Następnie kolbę podłącza się do pompki wodnej na jedną do dwóch minut, stale wstrząsając.

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Miareczkowanie potencjometryczne

Przed przystąpieniem do miareczkowania wzorcuje się pehametr za pomocą buforu o pH 7.

Do cylindra miarowego wprowadza się przygotowaną próbkę o objętości 10 ml. Następnie dodaje się około 10 ml wody destylowanej i roztwór wodorotlenku sodu w ilości potrzebnej do uzyskania pH 7 w temperaturze 20 °C. Wodorotlenek sodu dodaje się powoli, stale mieszając.

Miareczkowanie ze wskaźnikiem (błękit bromotymolowy)

- 1) próba wstępna — do cylindra miarowego odmierza się 25 ml przegotowanej wody destylowanej, 1 ml roztworu błękitu bromotymolowego oraz próbkę wina o objętości 10 ml. Dodaje się roztwór wodorotlenku sodu w ilości potrzebnej do zmiany barwy na niebieskozieloną. Następnie dodaje się 5 ml roztworu buforowego o pH 7;
- 2) próba właściwa — do cylindra miarowego odmierza się 30 ml przegotowanej wody destylowanej, 1 ml roztworu błękitu bromotymolowego oraz próbkę wina o objętości 10 ml. Następnie dodaje się roztwór wodorotlenku sodowego w ilości potrzebnej do uzyskania barwy identycznej z barwą uzyskaną w próbie wstępnej.

5. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

- 1) Kwasowość ogólną (A) w miligramorównoważnikach na litr oblicza się według wzoru:

$$A = 10 \times n,$$

gdzie n — oznacza objętość zużytego roztworu wodorotlenku sodu.

Wartość tę podaje się z dokładnością do jednego miejsca po przecinku;

- 2) Kwasowość ogólną (A') w g/l kwasu winowego oblicza się według wzoru: $A' = 0,075 \times A$.

Wartość tę podaje się z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

6. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania kwasowości ogólnej powtarzalność (r) wynosi:

- 1) $r = 0,9$ miligramorównoważnika/litr;

- 2) $r = 0,07$ g kwasu winowego/litr.

7. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bez-

względna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania kwasowości ogólnej odtwarzalność (R) wynosi:

- 1) dla win białych i różowych:
 - a) $R = 3,6$ miligramorównoważnika/litr,
 - b) $R = 0,3$ g kwasu winowego/litr;
- 2) dla win czerwonych:
 - a) $R = 5,1$ miligramorównoważnika/litr,
 - b) $R = 0,4$ g kwasu winowego/litr.

Załącznik nr 14

OZNACZANIE KWASOWOŚCI LOTNEJ

Kwasowość lotna jest sumą kwasów lotnych w stanie wolnym lub związanym, wyrażoną liczbą gramów kwasu octowego na liter. Zawartości kwasu węglowego i kwasu siarkowego nie zalicza się do kwasowości lotnej wina.

Metoda oznaczania kwasowości lotnej polega na miareczkowaniu oddestylowanych kwasów lotnych mianowanym roztworem wodorotlenku sodu. Z wina usuwa się uprzednio dwutlenek węgla, natomiast kwasowość tworzoną przez wolny i związany dwutlenek siarki odejmuje się od kwasowości destylatu. Odejmuje się również kwasowość tworzoną przez kwas sorbowy, który mógł być dodany do wina.

W destylacie jest obecna część kwasu salicylowego, który w niektórych krajach jest stosowany do utrwalania wina. Zawartość kwasu salicylowego również odejmuje się od kwasowości lotnej.

1. ODCZYNNIKI

- 1) krystaliczny kwas winowy ($C_4H_6O_6$);
- 2) 0,1-molowy roztwór wodorotlenku sodu (NaOH);
- 3) 1 % roztwór fenoloftaleiny w 96 % obj. alkoholu;
- 4) kwas chlorowodorowy (o gęstości $\rho_{20} = 1,18$ do 1,19 g/ml) rozcieńczony w stosunku 1:4 obj.;
- 5) 0,005-molowy roztwór jodu (I_2);
- 6) krystaliczny jodek potasu (KI);
- 7) roztwór skrobi o stężeniu 5 g/l, sporządzony przez zmieszanie 5 g skrobi z około 500 ml wody, doprowadzony do wrzenia przy ciągłym mieszaniu i gotowany przez 10 minut, a następnie dodanie 200 g chlorku sodu, ochłodzenie i uzupełnienie do 1 litra;
- 8) nasycony roztwór heptaoksoetaboranu sodu ($Na_2B_4O_7$) · H_2O , o stężeniu 55 g/l w temperaturze 20 °C.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) zestaw do destylacji z parą wodną, składający się z:
 - a) wytwornicy pary wodnej niezawierającej dwutlenku węgla,

- b) kolby z przewodem pary,
- c) kolumny destylacyjnej,
- d) chłodnicy;
- 2) pompki wodnej;
- 3) kolby próżniowej.

3. PRZYGOTOWANIE APARATURY

W celu przygotowanie zestawu do destylacji z parą wodną wykonuje się następujące testy:

- 1) do kolby zestawu do destylacji odmierza się 20 ml przegotowanej wody; zbiera się 250 ml destylatu i dodaje do niego 0,1 ml roztworu wodorotlenku sodu i dwie krople roztworu fenoloftaleiny; barwa różowa powinna utrzymywać się przez co najmniej 10 sekund, co oznacza, że para wodna nie zawiera dwutlenku węgla;
- 2) do kolby odmierza się 20 ml 0,1-molowego roztworu kwasu octowego; zbiera się 250 ml destylatu, który miareczkuje się roztworem wodorotlenku sodu, przy czym objętość roztworu zużytego do miareczkowania nie może być mniejsza niż 19,9 ml, co oznacza, że co najmniej 99,5 % kwasu octowego zostało oddestylowane z parą wodną;
- 3) do kolby miarowej odmierza się 20 ml 1-molowego roztworu kwasu mlekowego; zbiera się 250 ml destylatu i miareczkuje roztworem wodorotlenku sodowego; objętość zużytego do miareczkowania roztworu wodorotlenku sodowego nie może być większa niż 1 ml, co oznacza, że nie więcej niż 0,5 % kwasu mlekowego zostało oddestylowane.

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Usuwanie dwutlenku węgla

Przed przystąpieniem do oznaczenia z próbki usuwa się dwutlenek węgla w następujący sposób: do kolby próżniowej odmierza się około 50 ml wina i włącza pompkę wodną na jedną do dwóch minut, stale wstrząsając.

Destylacja z użyciem pary wodnej

20 ml wina pozbawionego dwutlenku węgla odmierza się do kolby zestawu destylacyjnego, dodaje około 0,5 g kwasu winowego i przeprowadza destylację. Zbiera się co najmniej 250 ml destylatu.

Miareczkowanie

Destylat miareczkuje się roztworem wodorotlenku sodu, wobec dwóch kropli fenoloftaleiny jako wskaźnika. Miareczkowanie kończy się w chwili pojawienia się różowej barwy roztworu niezanikającej w ciągu 30 sekund.

Wprowadzenie poprawki na dwutlenek siarki

Destylat bezpośrednio po zmiareczkowaniu zakwasa się czterema kroplami kwasu solnego. Następnie dodaje się 2 ml roztworu skrobi i kilka kryształów jodu potasu. Roztwór miareczkuje się za pomocą roztworu jodu do niebieskiego zabarwienia. Zużyta ilość jodu odpowiada zawartości wolnego dwutlenku siarki w destylacie. Następnie dodaje się nasycony roztwór heptaokso-tetraboranu sodu do uzyskania barwy różowej i miareczkuje związany dwutlenek siarki za pomocą roztworu jodu.

5. OBLICZANIE WYNIKU

1) kwasowość lotna (A), wyrażana w miligramorównoważnikach na litr z dokładnością do jednego miejsca po przecinku, wynosi: $A = 5(n - 0,1n' - 0,05n'')$;

2) kwasowość lotna (A^l), wyrażana w g kwasu octowego na litr z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku, wynosi: $A^l = 0,300(n - 0,1n' - 0,05n'')$,

gdzie:

n — oznacza objętość zużytego wodorotlenku sodu,

n' — oznacza objętość jodu zużytego do miareczkowania wolnego dwutlenku siarki,

n'' — oznacza objętość jodu zużytego do miareczkowania związanego dwutlenku siarki.

Jeśli wino zawiera kwas sorbowy, kwasowość pochodzącą z kwasu sorbowego odejmuje się od oznaczonej kwasowości lotnej, przy założeniu, że 100 mg kwasu sorbowego odpowiada kwasowości 0,89 milirównoważnika/l lub 0,053 g/l kwasu octowego oraz gdy jest znana zawartość kwasu sorbowego w mg/ml.

6. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy pomiędzy dwoma wynikami pojedynczego oznaczenia, uzyskanymi na tej samej próbce, w tych samych warunkach — ta sama osoba wykonująca, ten sam aparat, to samo laboratorium i w krótkim odstępie czasowym.

W przypadku oznaczania kwasowości lotnej powtarzalność (r) wynosi:

1) $r = 0,7$ miligramorównoważnika/litr;

2) $r = 0,04$ g kwasu octowego/litr.

7. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy pomiędzy dwoma wynikami pojedynczego oznaczenia, uzyskanymi na tej samej próbce, w różnych warunkach — różne osoby wykonujące, różne aparaty lub różne laboratoria, lub w różnym czasie.

W przypadku oznaczania kwasowości lotnej odtwarzalność (R) wynosi:

1) $R = 1,3$ miligramorównoważnika/litr;

2) $R = 0,08$ g kwasu octowego/litr.

8. OZNACZANIE KWASU SALICYLOWEGO PRZECHODZĄCEGO DO DESTYLATU OTRZYMYWANEGO PRZY OZNACZANIU KWASOWOŚCI LOTNEJ

Po oznaczeniu kwasowości lotnej i wprowadzeniu poprawki na zawartość dwutlenku siarki należy stwierdzić obecność kwasu salicylowego, po zakwaszeniu, przez fioletowe zabarwienie pojawiające się po dodaniu soli żelaza (III).

Oznaczanie kwasu salicylowego przechodzącego do destylatu wraz z kwasami lotnymi wykonuje się w drugim destylacie, przy czym używa się tej samej objętości destylatu, jaką wykorzystano do oznaczania kwasowości lotnej. Kwas salicylowy oznacza się kolorymetryczną metodą porównawczą. Oznaczoną zawartość kwasu salicylowego odejmuje się od kwasowości lotnej oznaczonej w destylacie uzyskanym w wyniku pierwszej destylacji.

Odczynniki:

1) kwas chlorowodorowy (HCl) (o gęstości $\rho_{20} = 1,18$ do 1,19 g/l);

2) 0,1-molowy roztwór tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);

3) 10 % (m/v) roztwór siarczanu żelazo-amonowego ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$);

4) 0,01-molowy roztwór salicylanu sodowego;

5) roztwór salicylanu sodowego ($\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_3$) o stężeniu 1,60 g/l.

Wykonanie oznaczania:

1) wykrywanie obecności kwasu salicylowego w destylacie wykorzystanym przy oznaczaniu kwasowości lotnej. Natychmiast po oznaczeniu kwasowości lotnej i wprowadzeniu poprawki na zawartość wolnego i związanego dwutlenku siarki do kolby stożkowej odmierza się 0,5 ml kwasu solnego, 3 ml roztworu tiosiarczanu sodu i 1 ml roztworu siarczanu żelazo-amonowego. Uzyskanie barwy fioletowej świadczy o obecności w próbce kwasu salicylowego;

2) oznaczanie zawartości kwasu salicylowego. Na kolbie stożkowej, wykorzystanej przy wykrywaniu

obecności kwasu salicylowego, zaznacza się kreską objętość destylatu, następnie kolbę opróżnia się i przepłukuje. Przeprowadza się destylację z parą wodną drugiej próbki wina o objętości 20 ml, zbierając destylat do kolby stożkowej. Następnie dodaje się 0,3 ml czystego kwasu solnego i 1 ml roztworu siarczanu żelazowo-amonowego. Zawartość kolby zabarwi się na fioletowo. Do kolby stożkowej, identycznej jak ww. kolba z zaznaczoną kreską, nalewa się wody destylowanej w ilości równej ilości destylatu, a następnie dodaje 0,3 ml czyste-

go kwasu solnego i 1 ml roztworu siarczanu żelazo-amonowego. Za pomocą biurety wprowadza się roztwór salicylanu sodowego do uzyskania barwy fioletowej o natężeniu odpowiadającym barwie roztworu w kolbie zawierającej destylat wina;

- 3) wprowadzanie poprawki do kwasowości lotnej. Od objętości n ml roztworu wodorotlenku sodu, zużytego do miareczkowania kwasów w destylacie podczas oznaczania kwasowości lotnej, odjąć objętość $0,1 \times n'''$, gdzie n''' oznacza objętość w ml roztworu dodanego z biurety.

Załącznik nr 15

OZNACZANIE KWASOWOŚCI ZWIĄZANEJ

Kwasowość związaną oblicza się z różnicy między kwasowością całkowitą a kwasowością lotną.

Kwasowość związaną wyraża się w miligramorównownikach na litr lub w g kwasu winowego na litr.

Załącznik nr 16

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU WINOWEGO

Kwas winowy wytrącany w postaci (\pm)winianu wapnia oznacza się grawimetrycznie. Dopuszczalne jest uzupełnienie tego oznaczania przy użyciu dodatkowo metody miareczkowej. Podczas wytrącania należy zapewnić, aby takie warunki, jak: pH, całkowita objętość roztworu zużytego do wytrącania, stężenie jonów wytrącających były takie same i aby nastąpiło całkowite wytrącenie (\pm)winianu wapnia oraz pozostanie w roztworze D(-)winianu wapnia. Jeżeli do wina dodano kwas mezowinowy, który powoduje niecałkowite wytrącanie (\pm)winianu wapnia, przed oznaczaniem przeprowadza się hydrolizę kwasu.

1. METODA GRAWIMETRYCZNA

Odczynniki:

- 1) roztwór octanu wapnia o stężeniu 10 g wapnia w litrze, który sporządza się z: 25 g węgla wapnia (CaCO_3), 40 ml lodowatego kwasu octowego (CH_3COOH) o gęstości $\rho_{20} = 1,05$ g/ml i wody w ilości potrzebnej do sporządzenia 1 litra roztworu; (\pm)winian wapnia, krystaliczny: $\text{CaC}_4\text{O}_6\text{H}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$. Roztwór sporządza się w następujący sposób: do zlewki na 400 ml odmierza się 20 ml roztworu kwasu L(+)-winowego (5 g/l), dodaje się 20 ml roztworu D(-)winianu amonu (6,126 g/l) i 6 ml roztworu octanu wapnia zawierającego 10 g wapnia w litrze. Całość pozostawia się na dwie godziny w celu wytrącenia winianu wapnia. Osad zbiera się na tyglu ze spiekem szklanym nr 4 i przemywa trzy razy około 30 ml wody destylowanej. Następnie osad suszy

się do stałej masy w suszarce w temperaturze 70 °C. Używając wyżej wskazanych ilości odczynników, uzyskuje się około 340 mg krystalicznego (\pm)winianu wapnia. Tak przygotowany winian wapnia przechowuje się w zakorkowanej butelce;

- 2) roztwór wytrącający o pH 4,75 sporządzony w następujący sposób: 122 mg kwasu D(-)winowego rozpuszcza się w wodzie w ilości niezbędnej do otrzymania około 900 ml roztworu, dodając 0,3 ml 25 % obj. roztworu wodorotlenku amonu (o gęstości $\rho_{20} = 0,97$ g/ml). Następnie dodaje się 8,8 ml roztworu octanu wapnia, uzupełnia wodą do 1 litra i sprowadza pH do 4,75 za pomocą kwasu octowego. Z uwagi na to, że (\pm)winian wapnia jest trudno rozpuszczalny w takim roztworze, należy dodać 5 ml (\pm)winianu wapnia na litr, a następnie po 12-godzinym mieszanii uzyskany roztwór przesącza się.

Wykonanie oznaczania:

- 1) wino bez dodatku kwasu mezowinowego — do zlewki na 600 ml odmierza się 500 ml roztworu strącającego i 10 ml wina. Całość miesza się i zapoczątkowuje wytrącanie winianu wapnia przez pocieranie ścianek naczynia końcem szklanej bagietki. Ciecz pozostawia się w zlewce do wytrącenia na okres 12 godzin. Następnie ciecz wraz z osadem przesącza się przez zważony tygiel ze spiekem szklanym nr 4, umieszczony na czystej kolbie próżniowej. W celu przeniesienia całości osadu tygiel popłukuje się uzyskanym przesączem, czyli

tym, w którym zachodziło wytrącanie winianu. Uzyskany osad suszy się do stałej masy w suszarce w temperaturze 70 °C i następnie waży;

- 2) wino, do którego dodano kwas mezowinowy lub istnieje przypuszczenie, że dodano do niego kwas mezowinowy — wymaga się, na wstępie, przeprowadzenia hydrolizy tego kwasu. Hydrolizę wykonuje się, odmierzając do kolby stożkowej o pojemności 50 ml — 10 ml wina i 0,4 ml lodowatego kwasu octowego. Na kolbie zamocowuje się chłodnicę zwrotną, a zawartość kolby gotuje się przez 30 minut. Po ostygnięciu przenosi się roztwór do zlewki o pojemności 600 ml. Kolbę przemywa się dwukrotnie za pomocą 5 ml wody. Obliczoną zawartość kwasu mezowinowego uwzględnia się w końcowym wyniku oznaczenia jako kwas winowy.

Obliczanie wyniku oznaczania:

Jedna cząsteczka (\pm)winianu wapnia odpowiada połowie cząsteczki kwasu L(+)-winowego w winie.

- 1) ilość kwasu winowego na litr wina, wyrażana w miligramorównoważnikach kwasu winowego, wynosi: $384,5 \times p$, gdzie p oznacza masę otrzymanego krystalicznego (\pm)winianu wapnia. Wartość ta podawana jest z dokładnością do jednego miejsca po przecinku;
- 2) ilość kwasu winowego na litr wina, wyrażana w gramach kwasu winowego, wynosi: $28,84 \times p$, gdzie p oznacza masę otrzymanego krystalicznego (\pm)winianu wapnia. Wartość ta podawana jest z dokładnością do jednego miejsca po przecinku;
- 3) ilość kwasu winowego na litr wina, wyrażana w gramach soli potasowej kwasu winowego, wynosi: $36,15 \times p$, gdzie p oznacza masę otrzymanego krystalicznego (\pm)winianu wapnia. Wartość ta podawana jest z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

2. PORÓWNAWCZA ANALIZA MIARECZKOWA

Odczynniki:

- 1) kwas chlorowodorowy (HCl) (1:5 v/v) (o gęstości $\rho_{20} = 1,18$ do $1,19$ g/ml);

- 2) 0,05-molowy roztwór EDTA, sporządzony z 18,61 g EDTA [sól dwusodowa kwasu etylenodwuamionocteroocowego ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)] i wody destylowanej w ilości potrzebnej do otrzymania 1000 ml roztworu;
- 3) 40 % (m/v) roztwór wodorotlenku sodu, sporządzony z: 40 g wodorotlenku sodu (NaOH) i wody destylowanej w ilości potrzebnej do otrzymania 1000 ml roztworu;
- 4) wskaźnik kompleksometryczny 1 % wagowo sporządzony z 1 g kwasu 2-hydroksy-1-(2-hydroksy-4-sulfo-1-naftylazo)-3-naftoesowego ($C_{21}H_{14}N_4O_7S \cdot 3H_2O$) i 100 g bezwodnego siarczanu sodu (Na_2SO_4).

Wykonanie oznaczania:

Uprzednio zważony tygiel ze spiekim szklanym zawierający osad (\pm)winianu wapnia umieszcza się na kolbie próżniowej. Osad rozpuszcza się w 10 ml rozcieńczonego kwasu solnego. Następnie tygiel przemywa się 50 ml wody destylowanej. Po przemyciu osadu dodaje się do tygla 5 ml roztworu wodorotlenku sodu i około 30 mg wskaźnika. Całość miareczkuje się roztworem EDTA.

Obliczanie wyniku oznaczania:

- 1) zawartość kwasu winowego w litrze wina, wyrażaną w miligramorównoważnikach/l z dokładnością do jednego miejsca po przecinku, oblicza się przez pomnożenie przez 5 ilości ml EDTA zużytych do miareczkowania;
- 2) ilość kwasu winowego na litr wina, wyrażana w g kwasu winowego, równa się: $0,375 \times n$, gdzie n oznacza ilość ml EDTA zużytych do miareczkowania. Wartość ta jest podawana z dokładnością do jednego miejsca po przecinku;
- 3) ilość kwasu winowego na litr wina, wyrażana w g winianu potasowego, równa się: $0,470 \times n$, gdzie n oznacza ilość ml EDTA zużytych do miareczkowania. Wartość ta jest podawana z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

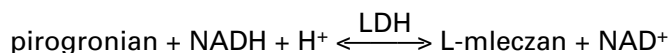
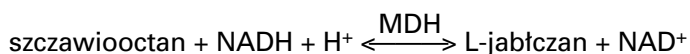
OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU CYTRYNOWEGO

Metoda jest oparta na enzymatycznej przemianie kwasu cytrynowego (cytrynianu) w oksaloocetan i octan w reakcji katalizowanej przez liazę cytrynianową (CL)



Oksaloocetan ulega samorzutnej dekarboksylacji do pirogronianu.

W obecności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) szczawioocetan i pirogronian są redukowane do L-jabłczanu i L-mleczanu przez zredukowany dwunukleotyd nikotynamido-adeninowy (NADH).



Ilość NADH utlenionego do NAD⁺ w powyższej reakcji jest proporcjonalna do ilości cytrynianu w próbce. Ilość utlenionego NADH jest oznaczana przez pomiar spadku absorbancji przy długości fali 340 nm.

1. ODCZYNNIKI

- 1) Roztwór 1 — roztwór buforowy o pH 7,8 (0,51-molowy roztwór glicyloglicyny; pH 7,8; Zn²⁺) (około 6 x 10⁻³ M). Roztwór sporządza się w następujący sposób: 7,13 g glicyloglicyny rozpuszcza się w około 70 ml wody redestylowanej, następnie sprowadza pH do 7,8 za pomocą około 13 ml 5-molowego roztworu wodorotlenku sodu, dodaje 10 ml roztworu chlorku cynku (ZnCl₂, 80 mg w 100 ml H₂O) i uzupełnia do 100 ml wodą redestylowaną;
- 2) Roztwór 2 — roztwór zredukowanego dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADH) (około 6 x 10⁻³ M). Roztwór sporządza się w następujący sposób: 30 mg NADH i 60 mg NaHCO₃ rozpuszcza się w 6 ml wody redestylowanej;
- 3) Roztwór 3 — roztwór dehydrogenazy jabłczanowej i dehydrogenazy mleczanowej (MDH/LDH 0,5 mg MDH/ml, 2,5 mg LDH/ml). Roztwór sporządza się w następujący sposób: 0,1 ml roztworu MDH (5 mg MDH/ml) miesza się z 0,4 ml roztworu siarczanu amonu (3,2-molowego) i 0,5 ml LDH (5 mg/ml). Zawiesina ta jest trwała w temperaturze 4 °C przez co najmniej rok od dnia sporządzenia;
- 4) Roztwór 4 — liaza cytrynianowa (CL, 5 mg białka/ml) sporządzona w następujący sposób: 168 mg liofilizatu rozpuszcza się w 1 ml wody lodowej. Roztwór ten jest trwały w temperaturze 4 °C przez co najmniej tydzień i przez co najmniej cztery tygodnie w stanie zamrożenia od dnia sporządzenia. Przed wykonaniem oznaczania sprawdza się aktywność enzymów;
- 5) poliwinylpolipirolidyna (PVPP).

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrofotometr umożliwiający pomiar przy długości fali 340 nm, przy której NADH wykazuje maksimum absorpcji. Jeżeli spektrofotometr taki nie jest dostępny, można użyć spektrofotometru o źródle widma nieciągłego, umożliwiającego pomiar przy 334 lub 365 nm. Ponieważ w oznaczeniu wykorzystuje się wartość bezwzględną absorbancji (nie wykorzystuje się krzywych wzorcowych, natomiast przeprowadza się kalibrację, uwzględniając współczynnik ekstynkcji NADH), należy sprawdzić skale długości fali i absorbancję widmową aparatu;
- 2) kuwety szklane o długości drogi optycznej 1 cm lub kuwety jednorazowego użytku;
- 3) mikropipety do odmierzenia objętości w zakresie od 0,02 do 2 ml.

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

- 1) o ile zawartość kwasu cytrynowego wynosi poniżej 400 mg/l — oznaczanie cytrynianu przeprowadza się zwykle bezpośrednio, bez uprzedniego usuwania związków dających zabarwienie i bez rozcieńczania;
- 2) jeśli zawartość kwasu cytrynowego jest równa lub wyższa niż 400 mg/l, wino rozcieńcza się do uzyskania zawartości cytrynianu od 20 do 400 mg/l (zawartość cytrynianu w badanej próbce wynosi od 5 do 80 µg);
- 3) w przypadku win czerwonych bogatych w związki fenolowe wytrąca się je za pomocą PVPP, postępując w następujący sposób: z około 0,2 g PVPP wytwarza się zawiesinę w wodzie, którą następnie odstawia się na 15 minut, po czym przesącza przez sączek karbowany. Wilgotną PVPP wybraną z sączka za pomocą topatki dodaje się do kolby stożkowej na 50 ml zawierającej 10 ml wina. Całość wytrząsa się przez dwie do trzech minut i przesącza.

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Za pomocą spektrofotometru z długością fali ustawioną na 340 nm oznacza się absorbancję przy użyciu 1 cm kuwety i w stosunku do powietrza jako wzorca o zerowej absorbancji (próbka odniesienia), czyli bez kuwety w drodze optycznej. W 1 cm kuwetach umieszcza się:

| | Kuweta odniesienia (próba ślepa) (ml) | Kuweta z badaną próbka (ml) |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Roztwór 1 | — 1,00 | 1,00 |
| Roztwór 2 | — 0,10 | 0,10 |
| Badana próbka | — — | 0,20 |
| Woda redestylowana | — 2,00 | 1,80 |
| Roztwór 3 | — 0,02 | 0,02 |

Całość miesza się i po około 5 minutach odczytuje absorbancję roztworu odniesienia i roztworu badanej próbki (A_1).

Po odczytaniu absorbancji dodaje się Roztworu 4 w ilości 0,02 ml do kuwety odniesienia oraz 0,02 ml do kuwety z badaną próbką.

Następnie miesza się, pozostawia do zakończenia reakcji (około 5 minut) i odczytuje absorbancję roztworu odniesienia i roztworu badanej próbki (A_2).

Z uwagi na to, że czas niezbędny do całkowitego przebiegu reakcji enzymatycznej może być różny dla kolejnych serii oznaczeń, podany czas należy traktować jedynie jako orientacyjny czas trwania reakcji. W związku z tym oznacza się czas dla każdej z serii.

5. WYRAŻANIE WYNIKU

Zawartość kwasu cytrynowego podaje się w mg/l w zaokrągleniu do liczby całkowitej.

Ogólny wzór obliczania zawartości kwasu cytrynowego w mg/l jest następujący:

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

gdzie:

V — oznacza objętość badanego roztworu w ml,

v — oznacza objętość badanej próbki w ml,

M — oznacza masę cząsteczkową oznaczanej substancji,

d — oznacza długość drogi optycznej kuwety w cm,

ε — oznacza współczynnik absorbancji NADH (przy 340 nm $\varepsilon = 6,3^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$),

ΔA — oznacza różnicę $(A_2 - A_1)_{\text{próbki}} - (A_2 - A_1)_{\text{próby ślepej}}$

Wykorzystując powyższe dane, otrzymuje się:

$$C = 479 \times \Delta A.$$

Jeżeli próbka została rozcieńczona w trakcie przygotowywania, wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia:

$$1) \text{ przy } 334 \text{ nm} \text{ — } C = 488 \times \Delta A \\ (= 6,2 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1});$$

$$2) \text{ przy } 365 \text{ nm} \text{ — } C = 887 \times \Delta A \\ (= 3,4 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}).$$

6. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania kwasu cytrynowego powtarzalność (r) wynosi:

$$1) \text{ przy zawartości kwasu cytrynowego poniżej } 400 \text{ mg/l: } r = 14 \text{ mg/l};$$

$$2) \text{ przy zawartości kwasu cytrynowego powyżej } 400 \text{ mg/l: } r = 28 \text{ mg/l}.$$

7. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania kwasu cytrynowego odtwarzalność (R) wynosi:

$$1) \text{ przy zawartości kwasu cytrynowego poniżej } 400 \text{ mg/l: } R = 39 \text{ mg/l};$$

$$2) \text{ przy zawartości kwasu cytrynowego powyżej } 400 \text{ mg/l: } R = 65 \text{ mg/l}.$$

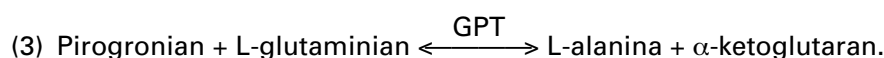
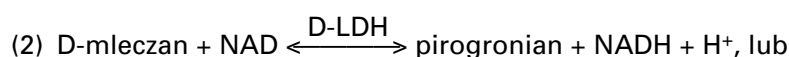
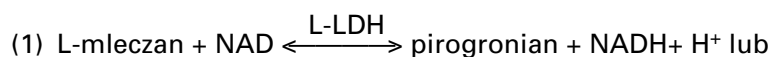
OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU MLEKOWEGO

Cała ilość kwasu mlekowego (L-mleczan i D-mleczan) jest utleniana przez dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD) do pirogronianu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę L-mleczanową (L-LDH) i dehydrogenazę D-mleczanową (D-LDH).

Równowaga tej reakcji jest zwykle przesunięta w stronę mleczanu. Usuwanie pirogronianu z miesza-

niny reakcyjnej przesuną równowagę reakcji w stronę tworzenia pirogronianu.

W obecności L-glutaminianu pirogronian przechodzi w L-alaninę w reakcji katalizowanej przez transaminazę glutaminowo-pirogronianową (GPT). Następuje to według reakcji:



Ilość powstającego NADH, mierzona przez wzrost absorbancji przy długości fali 340 nm, jest proporcjonalna do ilości mleczanu obecnego w próbce.

Możliwe jest wykonanie oznaczania kwasu L-mlekowego niezależnie przy wykorzystaniu reakcji (1) i (3), a kwasu D-mlekowego analogicznie za pomocą reakcji (2) i (3).

1. ODCZYNNIKI

- 1) Roztwór 1 — roztwór buforowy, pH 10 (0,6 mola/l glicyloglicyny; 0,1 mola/l L-glutaminianu). Roztwór sporządza się w następujący sposób — 4,75 g glicyloglicyny i 0,88 g kwasu L-glutaminowego rozpuszcza się w około 50 ml wody redestylowanej, sprowadza się pH do 10 za pomocą kilku mililitrów 10-molowego roztworu wodorotlenku sodu i uzupełnia do 60 ml wodą redestylowaną. Roztwór ten jest trwały przez co najmniej 12 miesięcy w temperaturze 4 °C;
- 2) Roztwór 2 — roztwór dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD), o stężeniu około 40×10^{-3} mola. Roztwór sporządza się w następujący sposób — 900 mg NAD rozpuszcza się w 30 ml wody redestylowanej. Roztwór ten jest trwały przez co najmniej 4 tygodnie w temperaturze 4 °C;
- 3) Roztwór 3 — zawiesina transaminazy glutaminowo-pirogronianowej (GPT), 20 mg/l. Zawiesina ta jest trwała przez co najmniej rok w temperaturze 4 °C;
- 4) Roztwór 4 — zawiesina dehydrogenazy L-mleczanowej (L-LDH), 5 mg/ml. Zawiesina ta jest trwała przez co najmniej rok w temperaturze 4 °C;
- 5) Roztwór 5 — zawiesina dehydrogenazy D-mleczanowej (D-LDH), 5 mg/ml. Zawiesina ta jest trwała przez co najmniej rok w temperaturze 4 °C.

Zaleca się sprawdzenie aktywności enzymów przed wykonaniem oznaczania.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrofotometr umożliwiający pomiar przy długości fali 340 nm, przy której NADH wykazuje maksimum absorpcji. Dopuszcza się także użycie spektrofotometru o źródle widma nieciągłego, umożliwiającego pomiar przy 334 lub 365 nm;

- 2) kuwety szklane o długości drogi optycznej 1 cm lub kuwety jednorazowego użytku;
- 3) mikropipety do odmierzania objętości w zakresie od 0,02 do 2 ml.

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Zasada przygotowania próbki jest następująca:

- 1) gdy zawartość kwasu mlekowego wynosi poniżej 100 mg/l. Oznaczanie kwasu mlekowego przeprowadza się dla wina, bez uprzedniego usuwania związków barwnych oraz bez rozcieńczania;
- 2) gdy zawartość kwasu mlekowego jest zawarta pomiędzy:
 - a) 100 mg/l a 1 g/l — wino rozcieńcza się wodą redestylowaną w stosunku 1:10,
 - b) 1 g/l a 2,5 g/l — wino rozcieńcza się wodą redestylowaną w stosunku 1:25,
 - c) 2,5 g/l a 5 g/l — wino rozcieńcza się wodą redestylowaną w stosunku 1:50.

Z uwagi na możliwość wprowadzenia kwasu L-mlekowego, którego obecność spowoduje uzyskanie błędnego wyniku, jest zabronione dotykaniem palcami jakiegokolwiek z tych części używanego szkła, które mogą mieć kontakt z mieszaniną reakcyjną.

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Oznaczanie kwasu mlekowego ogółem

Po sprawdzeniu, czy temperatura roztworu buforowego przed przystąpieniem do oznaczania mieści się w granicach od 20 do 25 °C, ustawia się długość fali w spektrofotometrze na 340 nm. Do oznaczania absorbancji stosuje się kuwety o długości drogi optycznej 1 cm.

| W kuwetach umieszcza się: | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| | Kuweta odniesienia (próba ślepa) (ml) | Kuweta z badaną próbką (ml) |
| Roztwór 1 | — 1,00 | 1,00 |
| Roztwór 2 | — 0,20 | 0,20 |
| Woda redestylowana | — 1,00 | 0,80 |
| Roztwór 3 | — 0,02 | 0,02 |
| Badana próbka | — — | 0,20 |

Zawartość kuwet miesza się mieszadłem szklanym lub prętym z materiału syntetycznego ze spłaszczonym końcem. Następnie po około 5 minutach mierzy się absorbancję roztworów w kuwecie z próbką odniesienia oraz w kuwecie z badaną próbką (A_1).

Po zmierzeniu absorbancji do kuwety odniesienia oraz kuwety z badaną próbką dodaje się 0,02 ml Roztworu 4 oraz 0,05 ml Roztworu 5. Następnie dokładnie miesza się, pozostawia do zakończenia reakcji (na około 30 minut) i mierzy absorbancję roztworów w kuwetach z próbką odniesienia i z badaną próbką (A_2).

Oznaczanie kwasu L-mlekowego i D-mlekowego

Możliwe jest niezależne prowadzenie oznaczania kwasu L-mlekowego i D-mlekowego przy zastosowaniu metody oznaczania kwasu mlekowego ogółem do momentu wyznaczenia wartości A_1 . Przy czym po zmierzeniu absorbancji A_1 dodaje się po 0,02 ml Roztworu 4, następnie dokładnie miesza się i pozostawia substancję do zakończenia reakcji. Czas ten wynosi około 20 minut. Następnie mierzy się absorbancję w kuwetach zawierających próbkę odniesienia i próbkę badaną (A_2). Po dokonaniu pomiaru absorbancji A_2 dodaje się 0,02 ml Roztworu 5, dokładnie miesza się, ponownie pozostawia się substancję do zakończenia reakcji. Czas ten wynosi około 30 minut. Następnie mierzy się absorbancję w kuwetach zawierających próbkę odniesienia i próbkę badaną (A_3).

Z uwagi na to, że czas trwania reakcji enzymatycznej może różnić się dla kolejnych serii oznaczeń, podane czasy trwania reakcji są przykładowe. Zaleca się oznaczanie faktycznego czasu dla każdej z serii. Przy oznaczaniu wyłącznie kwasu L-mlekowego czas inkubacji można skrócić do 10 minut.

5. WYRAŻANIE WYNIKU

Zawartość kwasu mlekowego podaje się w g/l, z dokładnością do jednego miejsca po przecinku. Obliczanie zawartości kwasu mlekowego wykonuje się według wzoru:

$$C = \frac{V \times M}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A,$$

gdzie:

V — oznacza objętość badanego roztworu w ml ($V = 2,24$ ml dla kwasu L-mlekowego, $V = 2,29$ dla kwasu D-mlekowego i kwasu mlekowego ogółem),

v — oznacza objętość badanej próbki w ml,

M — oznacza masę cząsteczkową oznaczanej substancji,

d — oznacza długość drogi optycznej kuwety w cm,

ε — oznacza współczynnik absorpcji NADH (w 340 nm, $\varepsilon = 6,3 \text{ mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$),

$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{próbki}} - (A_2 - A_1)_{\text{próby ślepej}}$ w przypadku kwasu mlekowego ogółem,

$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{próbki}} - (A_2 - A_1)_{\text{próby ślepej}}$ w przypadku kwasu L-mlekowego,

$\Delta A = (A_3 - A_2)_{\text{próbki}} - (A_3 - A_2)_{\text{próby ślepej}}$ w przypadku kwasu D-mlekowego.

Zawartość kwasu mlekowego ogółem i kwasu D-mlekowego oblicza się według wzoru:

$$C = 0,164 \times \Delta A$$

Jeżeli próbka została rozcieńczona w trakcie przygotowania do oznaczania, wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

Pomiar w 334 nm: $C = 0,167 \times \Delta A$ ($\varepsilon = 6,2 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

Pomiar w 365 nm: $C = 0,303 \times \Delta A$ ($\varepsilon = 3,4 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

Zawartość kwasu mlekowego i kwasu L-mlekowego oblicza się według wzoru:

$$C = 0,160 \times \Delta A$$

Jeżeli próbka została rozcieńczona w trakcie przygotowania do oznaczania, wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

Pomiar w 334 nm: $C = 0,163 \times \Delta A$ ($\varepsilon = 6,2 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

Pomiar w 365 nm: $C = 0,297 \times \Delta A$ ($\varepsilon = 3,4 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

6. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania kwasu mlekowego powtarzalność (r) wynosi:

$$r = 0,02 + 0,07 x_i \text{ g/l}$$

x_i — oznacza zawartość kwasu mlekowego w próbce w g/l.

7. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania kwasu mlekowego odtwarzalność (R) wynosi:

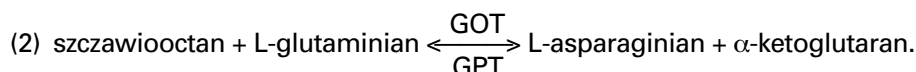
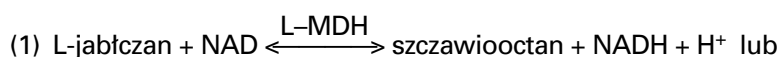
$$R = 0,05 + 0,125 x_i \text{ g/l}$$

x_i — oznacza zawartość kwasu mlekowego w próbce w g/l.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU L-JABŁKOWEGO

Kwas L-jabłkowy (L-jabłczan) jest utleniany przez dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD) do szczawiooctanu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę L-jabłczanową (L-DH). Równowaga tej reakcji jest zwykle wyraźnie przesunięta w stronę jabłczanu. Usuwanie szczawiooctanu z mieszaniny reakcyjnej

przesuwa równowagę reakcji w stronę tworzenia szczawiooctanu. W obecności L-glutaminianu szczawiooctan przechodzi w L-asparaginian w reakcji katalizowanej przez transaminazę glutaminianowo-szczawiooctanową (GOT):



Ilość powstającego NADH, mierzona przez wzrost absorbancji przy długości fali 340 nm, jest proporcjonalna do ilości L-jabłczanu obecnego w próbce.

1. ODCZYNNIKI

- 1) Roztwór 1 — roztwór buforowy, pH 10 (glicyloglicyna 0,6 M; L-glutaminian 0,1-molowy) sporządza się w następujący sposób — 4,75 g glicyloglicyny i 0,88 g kwasu L-glutaminowego rozpuszcza się w około 50 ml wody redestylowanej, następnie sprowadza się pH do 10 za pomocą około 4,6 ml dziesięciomolowego wodorotlenku sodu i uzupełnia do 60 ml wodą redestylowaną. Roztwór ten jest trwały przez co najmniej 12 tygodni w temperaturze 4 °C;
- 2) Roztwór 2 — roztwór dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD), około 47×10^{-3} mola, który sporządza się w następujący sposób — 420 mg NAD rozpuszcza się w 12 ml wody redestylowanej. Roztwór ten jest trwały przez co najmniej 4 tygodnie w temperaturze 4 °C;
- 3) Roztwór 3 — zawiesina transaminazy glutaminianowo-szczawiooctanowej (GOT), 2 mg/ml;
- 4) Roztwór 4 — roztwór dehydrogenazy L-jabłczanowej (L-MDH), 5 mg/ml.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrofotometr umożliwiający pomiar przy długości fali 340 nm, w której NADH wykazuje maksimum absorpcji albo spektrofotometr o źródle widma nieciągłego, umożliwiający pomiar przy 334 lub 365 nm;
- 2) kuwety szklane o długości drogi optycznej 1 cm lub kuwety jednorazowego użytku;
- 3) mikropipety do odmierzania objętości w zakresie 0,02 do 2 ml.

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

- 1) jeżeli zawartość kwasu L-jabłkowego oznaczana przy 365 nm wynosi poniżej 350 mg/l, oznaczanie jabłczanu przeprowadza się zwykle bezpośrednio, bez uprzedniego usuwania związków barwnych i bez rozcieńczania;

- 2) jeżeli zawartość kwasu L-jabłkowego oznaczana przy 365 nm jest wyższa niż 350 mg/l (zawartość L-jabłczanu w badanym roztworze wynosi od 3 do 35 µg), próbkę rozcieńcza się wodą redestylowaną do uzyskania zawartości L-jabłczanu od 30 do 350 mg/l;
- 3) jeżeli zawartość jabłczanu w winie wynosi mniej niż 30 mg/l, objętość próbki testowej można zwiększyć do 1 ml, a ilość dodawanej wody zmniejsza się w ten sposób, aby całkowita objętość roztworu w obu kuwetach była jednakowa.

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Absorbancję oznacza się za pomocą spektrofotometru z długością fali ustawioną na 340 nm przy użyciu kuwet o długości drogi optycznej 1 cm w stosunku do wzorca — powietrza o zerowej absorbancji (próbka odniesienia) bez kuwety na drodze światła lub w stosunku do wody.

W kuwetach o długości drogi optycznej 1 cm umieszcza się:

| | Kuweta odniesienia (próba ślepa) (ml) | Kuweta z badaną próbką (ml) |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Roztwór 1 | — 1,00 | 1,00 |
| Roztwór 2 | — 0,10 | 0,10 |
| Woda redestylowana | — 1,00 | 0,90 |
| Roztwór 3 | — 0,01 | 0,01 |
| Badana próbka | — — | 0,20 |

Zawartość kuwet miesza się, pozostawia na około 3 minuty, odczytuje absorbancję roztworów w kuwecie z próbką odniesienia i w kuwecie z badaną próbką (A₁).

Po odczytaniu absorbancji dodaje się Roztwór 4 w ilości po 0,01 ml do kuwety odniesienia oraz kuwety z badaną próbką. Następnie miesza się, pozostawia do zakończenia reakcji (około 5 do 10 minut) i odczytuje absorbancję roztworów w kuwecie z próbką odniesienia i w kuwecie z badaną próbką (A₂).

Z uwagi na to, że czas trwania reakcji enzymatycznej może różnić się dla kolejnych serii oznaczeń, podane powyżej czasy trwania reakcji są przykładowe. Zaleca się oznaczanie faktycznego czasu dla każdej z serii.

5. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Zawartość kwasu L-jabłkowego podaje się w g/l z dokładnością do jednego miejsca po przecinku. Zawartość kwasu cytrynowego (C) oblicza się według wzoru:

$$C = \frac{V \times M}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A,$$

gdzie:

V — oznacza objętość badanego roztworu w ml,

v — oznacza objętość badanej próbki w ml,

M — oznacza masę cząsteczkową oznaczanej substancji (dla kwasu L-jabłkowego M = 134,09),

d — oznacza długość drogi optycznej kuwety w cm,

ε — oznacza współczynnik absorbancji NADH (przy 340 nm $\varepsilon = 6,3 \text{ mmola}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$),

$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{próbki}} - (A_2 - A_1)_{\text{próby ślepej}}$

Wykorzystując powyższe dane, otrzymuje się:

$$C = 0,473 \times \Delta A \text{ g/l.}$$

Jeżeli próbka została rozcieńczona w trakcie przygotowywania, wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia:

1) przy pomiarze w 334 nm — $C = 0,482 \times \Delta A$;

2) przy pomiarze w 365 nm — $C = 0,876 \times \Delta A$.

6. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania kwasu L-jabłkowego powtarzalność (r) wynosi:

$$r = 0,03 + 0,034 x_i$$

x_i — oznacza stężenie kwasu jabłkowego w próbce w g/l.

7. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania kwasu L-jabłkowego odtwarzalność (R) wynosi:

$$R = 0,05 + 0,071 x_i$$

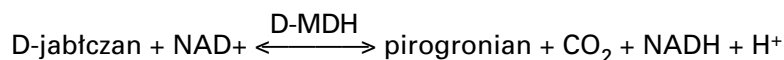
x_i — oznacza stężenie kwasu jabłkowego w próbce w g/l.

Załącznik nr 20

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU D-JABŁKOWEGO

Kwas D-jabłkowy (D-jabłczan) jest utleniany przez dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD) do szczawiooctanu w obecności dehydrogenazy D-jabł-

czanowej (D-MDH). Powstający szczawiooctan ulega rozpadowi do pirogronianu i dwutlenku węgla.



Ilość powstającego NADH jest proporcjonalna do ilości kwasu D-jabłkowego i jest mierzona przy długości fali 334, 340 lub 365 nm.

1. ODCZYNNIKI

Zestaw testowy na około 30 oznaczeń składający się z:

1) Roztwór 1 — około 30 ml roztworu, składającego się z buforu Hepesa [kwas 4-(2-hydroksylo)-1-piperazynoetanolosulfonowy] o pH = 9,0 i stabilizatorów;

2) Roztwór 2 — około 210 mg zliofilizowanego NAD;

3) Roztwór 3 — zliofilizowana D-MDH.

Przygotowanie roztworów:

1) Roztworu 1 używa się bez rozcieńczania, przed użyciem należy doprowadzić temperaturę roztworu do 20—25 °C;

2) Roztwór 2 rozpuszcza się w 4 ml wody redestylowanej;

- 3) Roztwór 3 rozpuszcza się w 0,6 ml wody redestylowanej, przed użyciem tego roztworu należy doprowadzić jego temperaturę od 20 do 25 °C.

Trwałość roztworów:

- 1) Roztwór 1 jest trwały przez co najmniej rok, jeżeli jest przechowywany w temperaturze 4 °C;
- 2) Roztwór 2 jest trwały przez 3 tygodnie, jeżeli jest przechowywany w temperaturze 4 °C, i przez dwa miesiące, jeżeli jest przechowywany w temperaturze minus 20 °C;
- 3) Roztwór 3 jest trwały przez 5 dni, jeżeli jest przechowywany w temperaturze 4 °C.

2. APARATURA

- 1) spektrofotometr umożliwiający pomiar przy długości fali 340 nm, przy której NADH i NADPH wykazują maksimum absorpcji, lub spektrofotometr o źródle widma nieciągłego, umożliwiającego pomiar przy 334 lub 365 nm;

- 2) kuwety szklane o długości drogi optycznej 1 cm lub kuwety jednorazowe;
- 3) mikropipety dostosowane do odmierzenia objętości od 0,01 do 2 ml.

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII

Przygotowanie próbki do analizy wykonuje się zgodnie z następującymi zasadami:

- 1) oznaczanie kwasu D-jabłkowego wykonywane jest bezpośrednio w winie bez potrzeby wcześniejszego odbarwienia;
- 2) oznaczanie kwasu D-jabłkowego przeprowadza się zwykle bezpośrednio w winie, bez uprzedniego rozcieńczania, o ile ilość kwasu D-jabłkowego w kuwetach ma wynosić od 2 mg do 50 g. W tym celu wino należy rozcieńczyć, uzyskując stężenie kwasu D-jabłkowego odpowiednio od 0,02 do 0,5 g/l lub od 0,02 do 0,3 g/l (w zależności od użytego aparatu).

Rozcieńczanie wina wykonuje się zgodnie z danymi w tabeli rozcieńczeń:

| Spodziewana ilość kwasu D-jabłkowego/litr | | Roztwór wodny | Roztwór czynnika F |
|------------------------------------------------|------------------------|---------------|--------------------|
| Pomiar wykonywany przy długości fali świetlnej | | | |
| 340 lub 334 nm | 365 nm | | |
| < 0,3 g 0,3 — 3,0 g | < 0,5 g 0,5 — 5,0 g | — 1 + 9 | 1 10 |

4. WYKONANIE OZNACZANIA

Za pomocą spektrofotometru z długością fali ustaloną na 340 nm oznacza się absorbancję przy użyciu 1 cm kuwet i w stosunku do powietrza jako wzorca o zerowej absorbancji (próbka odniesienia), czyli bez kuwety w drodze optycznej.

Do kuwet odmierza się:

| | Kuweta odniesienia (próba ślepa) (ml) | Kuweta z badaną próbką (ml) |
|------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Roztwór 1 | — 1,00 | 1,00 |
| Roztwór 2 | — 0,10 | 0,10 |
| Woda redestylowana | — 1,80 | 1,70 |
| Roztwór badanej próbki | — — | 0,10 |

Zawartość kuwet miesza się i odczytuje absorbancję próby ślepej i próbki badanej (A_1) po około 6 minutach. Następnie dodaje się do kuwety odniesienia i kuwety z badaną próbką 0,05 ml Roztworu 3. Po wymieszaniu pozostawia się do zakończenia reakcji (około 20 minut) i odczytuje absorbancję próby ślepej i próbki badanej (A_2).

Czas niezbędny do przeprowadzenia reakcji enzymatycznej może być różny dla poszczególnych serii

oznaczeń. Podany wyżej czas reakcji jest przykładowy. Czas reakcji określa się dla każdej serii oznaczeń.

Kwas D-jabłkowy reaguje bardzo gwałtownie. Enzym przekształca również kwas L-winowy, ale o wiele wolniej. To tłumaczy występowanie „reakcji petzających”, które mogą być korygowane w drodze ekstrakcji.

Zalecany sposób postępowania w przypadku „reakcji petzających”

„Reakcje petzające” są spowodowane głównie reakcjami ubocznymi enzymu, obecnością innych enzymów w matrycy próbki badanej lub interakcją jednego składnika lub więcej składników matrycy z czynnikami towarzyszącymi reakcji enzymatycznej.

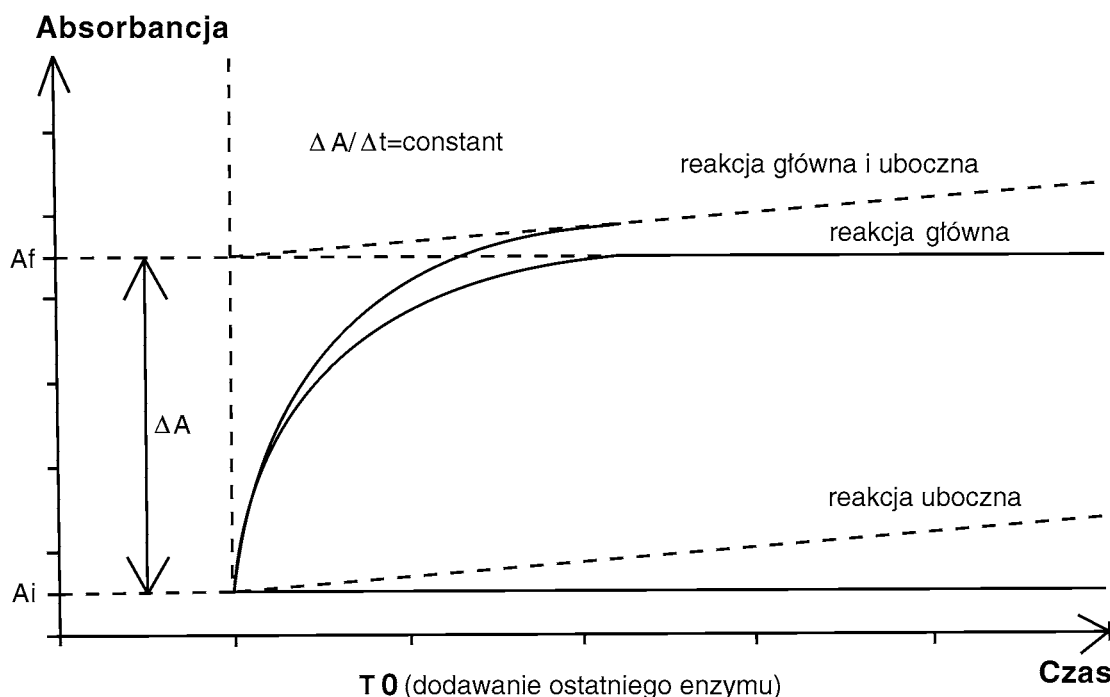
Gdy reakcja przebiega normalnie, absorbancja osiąga wartość stałą po czasie zależnym od prędkości określonej reakcji enzymatycznej, zazwyczaj po 10 do 20 minutach.

W przypadku gdy zachodzą reakcje uboczne, absorbancja nie osiąga stałej wartości, lecz stale rośnie w czasie, co określa się mianem „reakcji petzającej”.

Jeżeli zjawisko to występuje w czasie analizy, pomiar powinien być wykonywany w regularnych odstępach.

pach (co 2 do 5 minut), po czasie wymaganym dla osiągnięcia ostatecznej absorbancji roztworu standardowego. Przeprowadza się 5 lub 6 odczytów, jeśli absorbancja rośnie ze stałą prędkością, a następnie ekstra-

poluje graficznie lub matematycznie wartość absorbancji, jaką miałby roztwór w momencie ostatniego dodania enzymu (T 0). Różnicę absorbancji (Af—Ai) wykorzystywać do obliczenia stężenia substratu.



5. OBLICZANIE WYNIKU

Zawartość kwasu D-jabłkowego (C) w mg/l oblicza się według wzoru:

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

gdzie:

- V — oznacza objętość końcową w ml (2,95 ml),
 - v — oznacza objętość badanej próbki w ml (0,1 ml),
 - PM — oznacza ciężar cząsteczkowy oznaczanej substancji (dla kwasu D-jabłkowego PM = 134,09),
 - d — oznacza długość drogi optycznej kuwety w cm
- $\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{próbki}} - (A_2 - A_1)_{\text{próby ślepej}}$
- ε — oznacza współczynnik absorbancji NADH, który przy:
 - a) 340 nm wynosi (6,3 milimola⁻¹ × 1 × cm⁻¹),
 - b) 365 nm wynosi (3,4 milimola⁻¹ × 1 × cm⁻¹),
 - c) 334 nm wynosi (6,18 milimola⁻¹ × 1 × cm⁻¹).

Jeżeli próbka została rozcieńczona w trakcie przygotowywania, wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

Zawartość kwasu D-jabłkowego podaje się w mg/l z dokładnością do jedności.

6. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna

różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania kwasu D-jabłkowego powtarzalność (r) wynosi:

$$r = 11 \text{ mg/l.}$$

7. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania kwasu D-jabłkowego odtwarzalność (R) wynosi:

$$R = 20 \text{ mg/l.}$$

8. UWAGI

Z uwagi na stopień dokładności metody, jeśli uzyskana zawartość kwasu D-jabłkowego wyniesie poniżej 50 mg/l, uzyskany wynik powinien zostać dodatkowo potwierdzony przy użyciu innej metody analitycznej.

W celu uniknięcia możliwości zatrzymania aktywności enzymatycznej przez polifenole zawartość próbki wina w kuwecie nie powinna przekraczać 0,1 ml.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU JABŁKOWEGO OGÓŁEM

Kwas jabłkowy, rozdzielony metodą chromatografii anionowymiennej, jest oznaczany kolorymetrycznie w eluacie, przez pomiar barwy żółtej, tworzącej się w reakcji z kwasem chromotropowym w obecności stężonego kwasu siarkowego. Poprawka na obecność substancji przeszkadzających jest dokonywana przez odjęcie absorbancji uzyskanej w reakcji prowadzonej z 86 % kwasem siarkowym i kwasem chromotropowym (kwas jabłkowy nie reaguje przy takim stężeniu kwasu) od absorbancji uzyskanej przy użyciu kwasu siarkowego o stężeniu 96 %.

1. APARATURA I SPRZĘT

- 1) kolumna szklana o długości około 250 mm i średnicy wewnętrznej 35 mm, wyposażona w kran spustowy;
- 2) kolumna szklana o długości około 300 mm i średnicy wewnętrznej od 10 do 11 mm, wyposażona w kran spustowy;
- 3) łaźnia wodna z termostatem, o temperaturze 100 °C;
- 4) spektrofotometr ustawiony na wykonywanie pomiaru przy 420 nm, z kuwetami o długości drogi optycznej 1 cm.

2. ODCZYNNIKI

- 1) silnie zasadowa żywica jonowymienna;
- 2) 5 % (m/v) roztwór wodorotlenku sodu;
- 3) 30 % (m/v) roztwór kwasu octowego;
- 4) 0,5 % (m/v) roztwór kwasu octowego;
- 5) 10 % (m/v) roztwór siarczanu sodu;
- 6) kwas siarkowy o stężeniu od 95 % do 97 % wagowo;
- 7) kwas siarkowy o stężeniu 86 % wagowo;
- 8) 5 % (m/v) roztwór kwasu chromotropowego.

Przed każdym oznaczaniem przygotowuje się świeży roztwór przez rozpuszczenie 500 mg chromotropianu sodu ($C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$) w 10 ml wody destylowanej;

- 9) roztwór kwasu DL-jabłkowego, 0,5 g/l, sporządzony przez rozpuszczenie 250 g kwasu jabłkowego ($C_4H_6O_5$) w 10 % roztworze siarczanu sodu i uzupełnienie do 500 ml 10% roztworem siarczanu sodu.

3. WYKONANIE OZNACZANIA*Przygotowanie żywicy jonowymiennej*

Zatyczkę z waty bawełnianej nasączonej wodą destylowaną umieszcza się na dnie kolumny szklanej (o średnicy 35 mm i wysokości 250 mm) nad kranem. Do tej kolumny wlewa się zawiesinę żywicy jonowy-

miennej. Poziom cieczy powinien znajdować się 50 mm ponad warstwą żywicy. Następnie kolumnę przemywa się 1000 ml wody destylowanej i roztworem wodorotlenku sodu, który sączy się do chwili, gdy górny poziom cieczy w kolumnie znajdzie się 2 do 3 mm nad warstwą żywicy. Przemywanie roztworem wodorotlenku sodu powtarza się dwukrotnie. Następnie kolumnę pozostawia się na godzinę, po czym ponownie przemywa się za pomocą 1000 ml wody destylowanej. Tak przygotowaną kolumnę zalewa się kwasem octowym o stężeniu 30 % wagowych, który sączy się do chwili, gdy górny poziom cieczy w kolumnie znajdzie się 2 do 3 mm nad warstwą żywicy. Przemywanie kwasem octowym wykonuje się dwukrotnie. Przed użyciem kolumnę pozostawia się na co najmniej 24 godziny. Do rozpoczęcia następnej analizy pozostawia się kolumnę zalaną kwasem octowym o stężeniu 30 % wagowych.

Przygotowanie kolumny z żywicą jonowymienną

Na dnie kolumny (o średnicy 11 mm i wysokości 300 mm), nad kranem, umieszcza się zatyczkę z waty bawełnianej. Następnie wlewa się zawiesinę żywicy jonowymiennej do wysokości 10 cm. Po czym otwiera się kran i powoli spuszcza roztwór kwasu octowego do chwili, gdy górny poziom cieczy w kolumnie znajdzie się 2 do 3 mm nad warstwą żywicy. Następnie kolumnę przemywa się 50 ml porcjami 0,5 % kwasu octowego.

Rozdział kwasu DL-jabłkowego

Do kolumny wlewa się 10 ml wina lub moszczu. Próbkę sączy się przez kolumnę z taką prędkością, aby z kolumny wypływały pojedyncze krople (średnia prędkość: kropla na sekundę), i zamyka kran w chwili, gdy górny poziom cieczy znajdzie się 2 do 3 mm nad warstwą żywicy. Następnie kolumnę przemywa się za pomocą 50 ml 0,5 % kwasu octowego i 50 ml wody destylowanej, po czym ciecz sączy się przez kolumnę do chwili, gdy górny poziom cieczy znajdzie się 2 do 3 mm nad warstwą żywicy.

Kwasy zaabsorbowane przez żywicę jonowymienną eluuje się roztworem siarczanu sodu. Eluat zbiera się w kolbie miarowej na 100 ml.

Po skończonym rozdziale kolumnę regeneruje się.

Oznaczanie kwasu jabłkowego

Dwie próbówki, z szyjką szeroką, o pojemności 30 ml (i z doszlifowanym korkiem) oznaczają się jako A i B. Do każdej z nich wprowadza się 1 ml eluatu i 1 ml kwasu chromotropowego. Następnie dodaje się:

- 1) do próbówki A (próbka odniesienia) — 10 ml kwasu siarkowego o stężeniu 86 % wagowo;
- 2) do próbówki B (próbka badana) — 10 ml kwasu siarkowego o stężeniu 96 % wagowo.

Próbówki zamyka się korkiem i miesza przez wytrząsanie, uważając, aby nie zamoczyć korka. Następnie próbówki zanurza się we wrzącej łaźni wodnej na 10 minut, po czym ochładza się je w ciemności w temperaturze 20 °C przez 90 minut. Natychmiast mierzy się absorbancję badanej próbki w stosunku do próbki odniesienia przy długości fali świetlnej 420 nm w kuwekach o długości drogi optycznej wynoszącej 1 cm.

Sporządzanie roboczych roztworów wzorcowych

Do czterech kolb miarowych o pojemności 50 ml odmierza się pipetą odpowiednio 5; 10; 15 i 20 ml roztworu kwasu jabłkowego. Kolby uzupełnia się do 50 ml roztworem siarczanu sodowego. Uzyskane robocze roztwory wzorcowe odpowiadają eluatom otrzymanym z wina zawierającego odpowiednio 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 g/l kwasu jabłkowego.

Wykreślanie krzywej wzorcowej

Do próbówek, z szyjką szeroką i z doszlifowanym korkiem, o pojemności 30 ml, wprowadza się po 1 ml roboczego roztworu wzorcowego i 1 ml kwasu chromotropowego. Następnie dodaje się 10 ml kwasu siarkowego (96 %). Próbówki zamyka się korkiem i miesza przez wytrząsanie, uważając, aby nie zamoczyć korka. Następnie próbówki zanurza się we wrzącej łaźni wodnej na 10 minut, po czym ochładza się je w ciemności w temperaturze 20 °C przez 90 minut. Natychmiast mierzy się absorbancję badanej próbki w stosunku do próbki odniesienia (1 ml eluatu, 1 ml kwasu chromotropowego i 10 ml kwasu siarkowego 86 %) przy długości fali świetlnej 420 nm w kuwekach o długości drogi optycznej wynoszącej 1 cm.

Następnie sporządza się krzywą wzorcową w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza wartość absorbancji, c — oznacza stężenie kwasu jabłkowego w roboczych roztworach wzorcowych w g/l. Wykres absorbancji ma

postać linii prostej przechodzącej przez początek układu współrzędnych.

4. OBLICZANIE WYNIKU OZNACZANIA

Zawartość kwasu jabłkowego w eluacie w g/l odczytuje się, wykorzystując krzywą wzorcową dla zmierzonej wartości absorbancji, a wynik podaje się z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

5. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania kwasu jabłkowego powtarzalność (r) wynosi:

- 1) dla zawartości kwasu jabłkowego mniejszej niż 2 g/l: $r = 0,1$ g/l;
- 2) dla zawartości kwasu jabłkowego większej niż 2 g/l: $r = 0,2$ g/l.

6. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania kwasu jabłkowego odtwarzalność (R) wynosi:

$$R = 0,3 \text{ g/l.}$$

Załącznik nr 22

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU SORBOWEGO

Metoda spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie

Kwas sorbowy (kwas *trans, trans*, 2,4-heksadienowy), wydzielony metodą destylacji z parą wodną, oznacza się w destylacie wina metodą spektrofotometrii w nadfiolecie. Substancje, które zakłócają pomiar w nadfiolecie, usuwa się przez odparowanie do sucha z zastosowaniem lekko alkalicznego wodorotlenku wapnia. Przy stwierdzeniu w badanej próbce zawartości kwasu sorbowego w ilości poniżej 20 mg/l przeprowadza się dla potwierdzenia wyniku chromatografię cienkowarstwową.

1. ODCZYNNIKI

- 1) krystaliczny kwas winowy ($C_4H_6O_6$);
- 2) roztwór 0,02-molowy wodorotlenku wapnia [$Ca(OH)_2$];
- 3) wzorcowy roztwór kwasu sorbowego (20 mg/l) sporządza się, odważając: 20 mg kwasu sorbowego ($C_6H_8O_2$), który rozpuszcza się w około 2 ml 0,1-molowego roztworu wodorotlenku sodu, następnie roztwór przenosi się do kolby miarowej o pojemności 1000 ml i uzupełnia wodą do 1000 ml albo rozpuszcza się 26,8 mg sorbinianu potasu ($C_6H_7KO_2$) w wodzie i uzupełnia się wodą do uzyskania objętości 1 litra.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) zestaw do destylacji z parą wodną, składający się z:
 - a) wytwornicy pary wodnej bez dwutlenku węgla,
 - b) kolby z przewodem pary,
 - c) kolumny destylacyjnej,
 - d) chłodnicy;
- 2) łaźnia wodna o temperaturze 100 °C;
- 3) spektrofotometr umożliwiający pomiar absorbancji przy długości fali świetlnej 256 nm, wyposażony w kuwekę o długości drogi optycznej 1 cm.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Destylacja

W kolbie aparatu do destylacji z parą wodną umieszcza się 10 ml wina i dodaje się od 1 do 2 g krystalicznego kwasu winowego, następnie zbiera się 250 ml destylatu.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Wzorcowy roztwór kwasu sorbowego rozcieńcza się, uzyskując w ten sposób cztery robocze roztwory wzorcowe, zawierające odpowiednio 0,5 mg, 1,0 mg, 2,5 mg i 5,0 mg kwasu sorbowego w litrze. Następnie mierzy się absorbancję roztworów za pomocą spektrofotometru przy długości fali świetlnej 256 nm. Pierwszy pomiar należy przeprowadzić na próbie ślepej sporządzonej z wody destylowanej. Po dokonaniu pomiaru wykreśla się krzywą wzorcową dla roboczych roztworów wzorcowych w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorbancję, c — oznacza stężenie kwasu sorbowego w roboczych roztworach wzorcowych w mg/l. Wykres jest zależnością liniową.

Oznaczanie

W parownicy o średnicy 55 mm umieszcza się 5 ml destylatu i dodaje się 1 ml roztworu wodorotlenku wapnia $\text{Ca}(\text{OH})_2$, a zawartość parownicy odparowuje się do sucha na łaźni wodnej.

Pozostałość z odparowania rozpuszcza się w kilku ml wody destylowanej i przenosi się bez strat do kolby miarowej o pojemności 20 ml, następnie uzupełnia się do 20 ml wodą używaną do przepłukiwania.

Absorbancję mierzy się przy długości fali 256 nm za pomocą spektrofotometru, jako próby ślepej używa się roztworu, który otrzymuje się przez rozcieńczenie 1 ml roztworu wodorotlenku wapnia $\text{Ca}(\text{OH})_2$ wodą do objętości 20 ml.

Dla zmierzonej wartości absorbancji odczytuje się na krzywej wzorcowej zawartość (C) kwasu sorbowego w roztworze.

Obliczanie wyniku oznaczania

Zawartość kwasu sorbowego w winie, w mg na litr, wynosi $100 \times C$, gdzie C oznacza zawartość kwasu sor-

bowego w roztworze, wyrażoną w mg na litr, którego użyto do pomiaru spektrofotometrycznego.

Metoda chromatografii gazowej

Kwas sorbowy, wyekstrahowany octanem etylu, oznacza się metodą chromatografii gazowej z wzorcem wewnętrznym.

1. ODCZYNNIKI

- 1) eter etylowy ($\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ destylowany przed użyciem;
- 2) roztwór wzorca wewnętrznego — roztwór kwasu undekanowego ($\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$) o stężeniu 1 g/l w etanolu o stężeniu 95 % obj.;
- 3) wodny roztwór kwasu siarkowego (H_2SO_4) o gęstości $\rho_{20} = 1,84$ g/ml, rozcieńczony w stosunku 1:3 objętościowo.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) chromatograf gazowy wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny i kolumnę ze stali kwasoodpornej (o długości 4 m i średnicy około 0,325 cm), którą poddaje się uprzednio obróbce dimetylodichlorosilanem (DMDCS), z fazą stacjonarną składającą się z mieszaniny 5 % bursztynianu glikolu etylenowego i jednoprocetowego kwasu fosforowego ($\text{DEGS} - \text{H}_3\text{PO}_4$) lub mieszaniny 7 % adypinianu glikolu etylowego i jednoprocetowego kwasu fosforowego ($\text{DEGA} - \text{H}_3\text{PO}_4$), osadzoną na nośniku Gaschrom Q 80 — 100 mesh:
 - a) obróbka kolumny za pomocą DMDCS — przez kolumnę przepuszcza się roztwór zawierający od 2 g do 3 g DMDCS w toluenie, następnie kolumnę natychmiast przemywa się metanolem i przepłukuje azotem oraz przemywa się heksanem i ponownie przepłukuje większą ilością azotu,
 - b) warunki rozdziału:
 - temperatura pieca: 175 °C,
 - temperatura dozownika i detektora: 230 °C,
 - gaz nośny: azot (szybkość przepływu = 200 ml/min);
- 2) mikrostrzykawka o pojemności 10 μl , skalowana do 0,1 μl .

Możliwe jest użycie kolumn innego rodzaju, a szczególnie kolumny kapilarnej.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Przygotowanie próbki do analizy

Do szklanej próbówki o objętości około 40 ml, zamkniętej korkiem szklanym ze szlifem, odmierza się 20 ml wina, następnie dodaje się 2 ml roztworu wzorca wewnętrznego i 1 ml rozcieńczonego kwasu siarkowego.

Po zmieszaniu roztworów, przez kilkakrotne odwracanie próbówki dnem do góry, dodaje się 10 ml eteru etylowego ($\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$. Kwas sorbowy ekstrahuje się do

fazy organicznej, wstrząsając próbką przez 5 minut, następnie próbkę odstawia się do rozdzielenia faz.

Przygotowanie roztworu wzorcowego

Do przygotowania roztworu wzorcowego wybiera się wino, którego chromatogram ekstraktu eterowego nie wykazuje piku odpowiadającego kwasowi sorbowemu. Do wina dodaje się kwas sorbowy w ilości 100 mg na litr, następnie 20 ml. Tak przygotowane próbki poddaje się obróbce.

Rozdział chromatograficzny

Do chromatografu przy użyciu mikrostrzykawkki wprowadza się kolejno 2 μ l fazy eterowej.

Rejestrując odpowiednie chromatogramy, sprawdza się zgodność czasów retencji kwasu sorbowego i wzorca wewnętrznego. Następnie mierzy się wysokość lub powierzchnię każdego zarejestrowanego piku.

Obliczanie wyniku oznaczania

Zawartość kwasu sorbowego (C) w analizowanym winie, wyrażoną w mg na litr, oblicza się według wzoru:

$$C = 100 \times (h : H) \times (I : i),$$

gdzie:

- H — oznacza wysokość piku kwasu sorbowego w roztworze wzorcowym,
- h — oznacza wysokość piku kwasu sorbowego w analizowanej próbce,
- I — oznacza wysokość piku wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym.

Zawartość kwasu sorbowego jest możliwa do obliczenia w analogiczny sposób przez określenie wielkości powierzchni pików.

Wykrywanie śladowych ilości kwasu sorbowego metodą chromatografii cienkowarstwowej

Kwas sorbowy, wyekstrahowany octanem etylu, rozdziela się metodą chromatografii cienkowarstwowej, a jego zawartość oznacza się półilościowo.

1. ODCZYNNIKI

- 1) eter etylowy (C_2H_5)₂O;
- 2) roztwór wodny kwasu siarkowego (H_2SO_4 o stężeniu $\rho_{20} = 1,84$ g/ml), rozcieńczony w stosunku 1:3 obj.;
- 3) roztwór wzorcowy kwasu sorbowego w około 10 % obj. roztworze etanolu w wodzie, zawierający 20 mg kwasu w litrze;
- 4) faza ruchoma — heksan : pentan : kwas octowy ($C_6H_{14}/C_5H_{12}/CH_3COOH$ o stężeniu $\rho_{20} = 1,05$ g/ml), w proporcji 20:20:3.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) płytki do chromatografii cienkowarstwowej o wymiarach 20 cm x 20 cm, pokryte żelom poliamidowym (grubość warstwy żelu 0,15 mm) z dodatkiem wskaźnika fluorescencyjnego;
- 2) komora do chromatografii cienkowarstwowej;
- 3) mikropipety lub mikrostrzykawkki do nanoszenia objętości 5 μ l z dokładnością $\pm 0,01$ μ l;
- 4) promiennik lampowy nadfioletu 254 nm.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Przygotowanie próbki do analizy

Do szklanej próbki o pojemności około 25 ml, z doszlifowanym korkiem szklanym, odmierza się 10 ml wina. Dodaje się 1 ml rozcieńczonego kwasu siarkowego oraz 5 ml eteru etylowego, następnie zawartość próbki miesza się przez kilkakrotne odwracanie próbki dnem do góry i pozostawia do rozdzielania faz.

Przygotowanie rozcieńczonego roztworu wzorcowego

Z wzorcowego roztworu kwasu sorbowego przygotowuje się 5 rozcieńczonych roztworów wzorcowych zawierających odpowiednio 2, 4, 6, 8 i 10 mg kwasu sorbowego w litrze.

Rozdział chromatograficzny

Za pomocą mikropipety lub mikrostrzykawkki nanosi się 5 μ l przygotowanej fazy eterowej i 5 μ l każdego z rozcieńczonych roztworów wzorcowych w punktach oddalonych o 2 cm od dolnej krawędzi płytki i 2 cm od siebie nawzajem.

Do komory chromatograficznej wlewa się fazę ruchomą odpowiednio do wysokości około 0,5 cm i pozostawia się do nasycenia komory parami rozpuszczalnika. Następnie płytkę umieszcza się w komorze. Chromatogram rozwija się na drodze od 12 cm do 15 cm (czas rozwijania około 30 minut). Następnie płytkę osusza się w strumieniu chłodnego powietrza, a chromatogram ogląda się pod promiennikiem nadfioletu przy 254 nm.

Plamy wskazujące na obecność kwasu sorbowego mają barwę ciemnofioletową na żółtym fluorescencyjnym tle płytki.

Interpretacja oznaczania

Półilościowe oznaczenie kwasu sorbowego w stężeniu od 2 do 10 mg na litr ustala się przez porównanie natężenia barwy plam uzyskanych w wyniku rozdziału próbki z intensywnością plam roztworów wzorcowych. Stężenie 1 mg na litr oznacza się, nanosząc na płytkę 10 μ l roztworu badanej próbki.

Kwas sorbowy o stężeniu powyżej 10 mg na litr oznacza się, nanosząc na płytkę mniej niż 5 μ l roztworu badanej próbki odmierzonym mikrostrzykawkką.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU L-ASKORBINOWEGO

Metoda umożliwia oznaczanie kwasu L-askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego obecnego w winie lub moszczu.

Kwas L-askorbinowy jest utleniany na węglu aktywnym do kwasu dehydroaskorbinowego. Ten ostatni daje związek fluorescencyjny w reakcji z ortofenylenodiaminą (OPDA). Próba kontrolna w obecności kwasu borowego umożliwia oznaczanie fluorescencji zakłóconej przez wytworzenie kompleksu kwasu borowego z kwasem dehydroaskorbinowym i odjęcie wyniku uzyskanego w tej próbie od wyniku oznaczania.

1. ODCZYNNIKI

- 1) roztwór dwuchlorowodorku ortofenylenodiaminy ($C_6H_{10}Cl_2N_2$) przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem, rozpuszczając 0,02 g dwuchlorowodorku ortofenylenodiaminy ($C_6H_{10}Cl_2N_2$) w 100 ml wody;
- 2) roztwór trójwodnego octanu sodowego sporządza się, rozpuszczając 500 g trójwodnego octanu sodowego ($CH_3COONa \cdot 3 H_2O$) w litrze wody;
- 3) roztwór kwasu borowego i octanu sodu przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem, rozpuszczając 3 g kwasu borowego (H_3BO_3) w 100 ml roztworu trójwodnego octanu sodowego, ($CH_3COONa \cdot 3 H_2O$), 500 g/l;
- 4) roztwór lodowatego kwasu octowego (CH_3COOH) (o gęstości $\rho_{20} = 1,05$ g/ml), rozcieńczony do 56 % obj., o pH około 1,2;
- 5) wzorcowy roztwór kwasu L-askorbinowego (1 g/l) sporządza się bezpośrednio przed użyciem, rozpuszczając 50 mg kwasu L-askorbinowego ($C_6H_8O_6$) osuszonego w eksykatorze zabezpieczonym przed dostępem światła w 50 ml roztworu kwasu octowego;
- 6) bardzo czysty węgiel aktywny, który przygotowuje się w następujący sposób: do dwulitrowej kolby stożkowej odważa się 100 g węgla aktywnego i dodaje 500 ml 10 % obj. roztworu kwasu solnego (HCl) ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml), następnie zawartość kolby doprowadza się do wrzenia i przesącza przez tygiel ze spiekim szklanym nr 3, tak przygotowany węgiel przenosi się do kolby stożkowej o pojemności 2 litrów, następnie dodaje się litr wody, wstrząsa się kolbą, a zawartość kolby przesącza się przez tygiel ze spiekim szklanym nr 3, czynność powtarza się dwukrotnie; pozostałość przesącza umieszcza się w piecu o temperaturze kontrolowanej 115 ± 5 °C na 12 godzin.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) fluorymetr;
- 2) tygiel ze spiekim szklanym nr 3;
- 3) próbówki o średnicy około 10 mm;

- 4) mieszałdo — pręt szklany;
- 5) kolby miarowe o pojemności 100 ml.

3. WYKONANIE OZNACZANIA**Przygotowanie próbki**

Pobraną próbkę wina albo moszczu rozcieńcza się 56 % roztworem kwasu octowego w kolbie miarowej o pojemności 100 ml, w celu uzyskania roztworu o zawartości kwasu L-askorbinowego od 0 do 60 mg/l, następnie dokładnie miesza się zawartość kolby i dodaje się 2 g węgla aktywnego. Tak przygotowaną próbkę odstawia się na 15 minut, mieszając od czasu do czasu, następnie zawartość próbki przesącza się przez zwykłą bibułę filtracyjną, odrzucając kilka pierwszych mililitrów przesącza.

Próbka ślepa

Do kolby miarowej o pojemności 100 ml wprowadza się po 5 ml przesącza, następnie dodaje się 5 ml roztworu mieszaniny kwasu borowego i octanu sodu.

Próbka badana

Do kolby miarowej o pojemności 100 ml wprowadza się po 5 ml przesącza, następnie dodaje się 5 ml roztworu octanu sodu.

Tak przygotowane próbki odstawia się na 15 minut, mieszając od czasu do czasu, następnie uzupełnia się wodą destylowaną do 100 ml.

Z każdej kolby pobiera się po 2 ml roztworu, następnie dodaje się 5 ml roztworu dwuchlorowodorku ortofenylenodiaminy i dokładnie miesza się. Reakcję prowadzi się przez około 30 minut. Po upływie 30 minut, gdy barwa roztworu pociemnieje, przeprowadza się pomiar fluorometryczny.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Do trzech kolb miarowych o pojemności 100 ml odmierza się odpowiednio 2 ml, 4 ml i 6 ml wzorcowego roztworu kwasu L-askorbinowego, następnie uzupełnia się do 100 ml roztworem kwasu octowego i dokładnie miesza się. Przygotowane w ten sposób roztwory wzorcowe zawierają 2, 4 i 6 mg kwasu L-askorbinowego w 100 ml.

Do każdej kolby dodaje się 2 g węgla aktywnego i odstawia się na 15 minut, mieszając od czasu do czasu. Tak przygotowane roztwory wzorcowe sączy się przez zwykłą bibułę filtracyjną, odrzucając kilka pierwszych mililitrów przesącza.

Następnie odmierza się 5 ml każdego przesącza do trzech kolb miarowych o pojemności 100 ml (pierwsza seria) — próbka ślepa. Czynność tę należy powtórzyć drugi raz w celu otrzymania drugiej serii wyników dla trzech kolb miarowych.

Do każdej z kolb pierwszej serii, które odpowiadają próbie ślepej, dodaje się 5 ml roztworu kwasu borowego i kwasu octowego, natomiast do każdej z kolb stanowiących drugą serię dodaje się 5 ml roztworu octanu sodu.

Kolby z dwóch serii odstawia się na 15 minut, mieszając od czasu do czasu, następnie uzupełnia się wodą destylowaną do 100 ml.

Z każdej kolby pobiera się 2 ml roztworu oraz dodaje się 5 ml roztworu dwuchlorowodoru ortofenylenodiaminy, miesza się i prowadzi reakcję przez około 30 minut do pociemnienia barwy roztworu, następnie przeprowadza się pomiar fluorometryczny.

Wykonanie pomiaru fluorometrycznego

Dla roztworu, którego używa się do przygotowania krzywej wzorcowej, oraz dla roztworu badanego ustawia się zero na skali pomiarowej, wykorzystując odpo-

wiednią próbkę wzorcową. Następnie mierzy się natężenie fluorescencji każdego roztworu wzorcowego i badanej próbki.

Po dokonaniu pomiaru wykreśla się krzywą wzorcową w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza natężenie fluorescencji, c — oznacza stężenie kwasu L-askorbinowego. Wykres ma postać linii prostej przechodzącej przez początek układu współrzędnych.

Dla wartości fluorescencji badanej próbki z krzywej wzorcowej odczytuje się zawartość (C) kwasu L-askorbinowego + kwasu dehydroaskorbinowego w badanym roztworze.

Obliczanie wyniku oznaczania

Zawartość kwasu L-askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego w winie w mg na litr oblicza się, mnożąc uzyskaną z pomiaru fluorometrycznego wartość (C) przez współczynnik rozcieńczenia.

Załącznik nr 24

OZNACZANIE WARTOŚCI pH

Metoda oznaczania pH polega na pomiarze różnicy potencjału między dwoma elektrodami zanurzonymi w badanej cieczy. Jedna elektroda wykazuje potencjał, który jest funkcją wartości pH cieczy, natomiast druga elektroda będąca elektrodą odniesienia wykazuje stały i znany potencjał.

1. ODCZYNNIKI

Roztwory buforowe:

- 1) nasycony roztwór wodorowinianu potasu, zawierający co najmniej 5,7 g wodorowinianu potasu ($C_4H_5KO_6$) w litrze w temperaturze 20 °C, roztwór przechowuje się do 2 miesięcy, dodając 0,1 g tymolu na 200 ml, o pH:
 - 3,57 w temperaturze 20 °C,
 - 3,56 w temperaturze 25 °C,
 - 3,55 w temperaturze 30 °C;
- 2) 0,05-molowy roztwór wodoroftalanu potasu zawierający 10,211 g wodoroftalanu potasu ($C_8H_5KO_4$) w litrze w temperaturze 20 °C, który przechowuje się nie dłużej niż dwa miesiące, o pH:
 - 3,999 w temperaturze 15 °C,
 - 4,003 w temperaturze 20 °C,
 - 4,008 w temperaturze 25 °C,
 - 4,015 w temperaturze 30 °C;
- 3) wzorcowy roztwór buforowy, sporządzony w następujący sposób: 3,402 g diwodoroortofosforan(V)potasu (KH_2PO_4) i 4,354 g wodoroortofosfo-

ranu(V)dipotasu (K_2HPO_4) rozpuszcza się w wodzie i uzupełnia się wodą do 1000 ml. Tak sporządzony roztwór przechowuje się nie dłużej niż dwa miesiące, o pH:

- 6,90 w temperaturze 15 °C,
- 6,88 w temperaturze 20 °C,
- 6,86 w temperaturze 25 °C,
- 6,85 w temperaturze 30 °C.

2. APARATURA

- 1) pehametr, wyskalowany w jednostkach pH, umożliwiający pomiar z dokładnością co najmniej $\pm 0,05$ jednostki pH;
- 2) elektrody:
 - a) elektroda szklana, przechowywana w wodzie destylowanej,
 - b) kalomelowa nasycona elektroda odniesienia, przechowywana w nasyconym roztworze chlorku potasowego,
lub
 - c) elektroda kombinowana, przechowywana w wodzie destylowanej.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Przygotowanie próbki do analizy

Próbkę moszczu lub wina pobiera się bezpośrednio z moszczu lub wina.

Zerowanie aparatu

Aparat zeruje się przed każdym pomiarem.

Kalibracja pehametru

Pehametr skaluje się w temperaturze 20 °C, stosując roztwory buforowe o pH = 6,88 i pH = 3,57 o temperaturze 20 °C. Do sprawdzenia kalibracji skali używa się roztworu buforowego o pH = 4,00 o temperaturze 20 °C.

Wykonanie oznaczania

Elektrodę zanurza się w badanej próbce, której temperatura wynosi od 20 °C do 25 °C, temperatura ma jak

najmniej odbiegać od 20 °C. Następnie odczytuje się wartość pH na skali pehametru.

Wykonuje się co najmniej dwa równoległe oznaczenia badanej próbki.

Wynik końcowy oblicza się jako średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń.

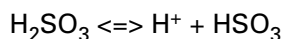
Obliczanie wyniku oznaczania

Wartość pH moszczu lub wina podaje się z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

Załącznik nr 25

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI DWUTLENKU SIARKI

Wolny dwutlenek siarki jest to dwutlenek siarki obecny w moszczu lub winie w formie kwasu siarkawego (H_2SO_3) lub powstającej z jego rozpadu cząsteczki HSO_3 . Równowaga między tymi dwoma postaciami jest funkcją pH i temperatury:



H_2SO_3 jest cząsteczkowym dwutlenkiem siarki.

Dwutlenek siarki ogółem są to wszystkie formy dwutlenku siarki obecne w winie, zarówno w stanie wolnym, jak i związane ze składnikami wina.

Wolny i związany dwutlenek siarki

Wina i moszcze

Dwutlenek siarki jest wydzielany z próbki strumieniem powietrza lub azotu, następnie jest wiązany i utleniany przez rozcieńczony i obojętny roztwór nadtlenu wodoru. Powstały kwas siarkowy oznacza się, miareczkując mianowanym roztworem wodorotlenku sodowego. Wolny dwutlenek siarki jest wydzielany z próbki przez odparowanie w temperaturze około 10 °C. Dwutlenek siarki ogółem jest wydzielany z wina przez odparowanie w temperaturze około 100 °C.

1. ODCZYNNIKI

- 1) 85 % kwas fosforowy (H_3PO_4 , o gęstości $\rho_{20} = 1,71$ g/ml);
- 2) roztwór nadtlenu wodoru sporządza się, rozpuszczając 9,1 g (H_2O_2) w litrze wody;
- 3) wskaźnik, który sporządza się ze 100 mg czerwieni metylowej, 50 mg błękitu metylenowego i 100 ml 50 % obj. alkoholu;
- 4) 0,01-molowy roztwór wodorotlenku sodu (NaOH).

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) aparat o konstrukcji odpowiadającej następującemu opisowi:
 - a) barboter o przepływie gazu około 40 litrów na godzinę,
 - b) rurka doprowadzająca gaz do barbotera o zakończeniu w formie kulki o średnicy 1 cm, z dwudziestoma otworami, każdy o średnicy 0,2 mm, albo w formie płytki ze spieku szklanego, który powoduje powstawanie dużej ilości bardzo małych pęcherzyków gazu,
 - c) chłodnica zbudowana z czterech wewnętrznych koncentrycznych rurek o średnicach 45 mm, 34 mm, 27 mm i 10 mm,
 - d) butelka do ograniczania redukcji ciśnienia, którą powoduje pompka wodna,
 - e) przepływomierz z rurkami półkapilarnymi zainstalowany pomiędzy barboterem a butelką, dla utrzymania próżni na odpowiednim poziomie,
 - f) kolba o pojemności 250 ml;
- 2) mikrobiureta.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Oznaczanie wolnego dwutlenku siarki

Przed wykonaniem oznaczania wino przechowuje się w całkowicie napełnionej butelce w temperaturze 20 °C przez dwa dni.

Do barbotera odmierza się 2 ml do 3 ml roztworu nadtlenu wodoru i dwie krople wskaźnika, po czym zobojętnia się roztwór nadtlenu wodoru 0,01-molowym roztworem wodorotlenku sodu, następnie barboter przyłącza się do aparatu.

Do kolby wprowadza się 50 ml próbki i 15 ml kwasu fosforowego, następnie kolbę przyłącza się do aparatu.

Przez 15 minut przez aparat przepuszcza się powietrze lub azot. Wolny dwutlenek siarki wydzielający się z próbki utlenia się do kwasu siarkowego. Następnie barboter odłącza się od aparatu, a powstały kwas siarkowy miareczkuje się 0,01-molowym roztworem wodorotlenku sodu.

Obliczanie wyniku oznaczania

Ilość uwolnionego dwutlenku siarki podaje się w mg/l, zaokrąglając wynik do liczby całkowitej.

Zawartość wolnego dwutlenku siarki w miligramach na litr wynosi $6,4 n$, gdzie n oznacza ilość ml 0,01-molowego roztworu wodorotlenku sodu użytego do miareczkowania.

Oznaczanie dwutlenku siarki ogółem

Jeżeli oczekiwana zawartość dwutlenku siarki ogółem w próbce nie jest większa niż 50 mg na litr, do kolby odmierza się 50 ml próbki i 15 ml 85 % kwasu fosforowego, następnie kolbę przyłącza się do aparatu.

Jeżeli szacunkowa zawartość dwutlenku siarki ogółem w próbce jest większa niż 50 mg na litr, do kolby odmierza się 20 ml próbki i 5 ml 85 % kwasu fosforowego, następnie kolbę przyłącza się do aparatu.

Do barbotera odmierza się 2 ml do 3 ml roztworu nadtlenu wodoru, zubożonego w opisany sposób, następnie wino w kolbie doprowadza się do wrzenia za pomocą płomienia o wysokości 4 cm do 5 cm dotykającego dna kolby. Nie należy umieszczać kolby na płytce metalowej, lecz na krążku z otworem o średnicy około 30 mm, co zapobiega przegrzaniu substancji wydzielanych z wina, które osadzają się na ściankach kolby.

Próbkę utrzymuje się w stanie wrzenia, przepuszczając przez nią strumień powietrza lub azotu. W czasie 15 minut wydziela się i utlenia z próbki całość dwutlenku siarki wolnego i związanego. Ilość wytworzonego kwasu siarkowego oblicza się, miareczkując 0,01-molowym roztworem wodorotlenku sodu.

Obliczanie wyniku oznaczania

Zawartość dwutlenku siarki ogółem wyraża się w mg/l.

Zawartość dwutlenku siarki ogółem w miligramach na litr wynosi:

- $6,4 n$ dla próbki o niskiej zawartości dwutlenku siarki w przypadku, gdy objętość badanej próbki wynosi 50 ml,
- $16 n$ dla pozostałych próbek w przypadku, gdy objętość badanej próbki wynosi 20 ml, gdzie n oznacza ilość ml roztworu wodorotlenku sodu użytego do miareczkowania.

4. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku powyższego oznaczania powtarzalność (r) wynosi:

- 1) $r = 1$ mg/l dla próbki badanej o objętości $50 \text{ ml} < 50 \text{ mg/l}$;
- 2) $r = 6$ mg/l dla próbki badanej o objętości $20 \text{ ml} > 50 \text{ mg/l}$.

5. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

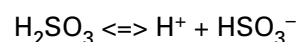
W przypadku powyższego oznaczania odtwarzalność (R) wynosi:

- 1) $R = 9$ mg/l dla próbki badanej o objętości $50 \text{ ml} < 50 \text{ mg/l}$;
- 2) $R = 15$ mg/l dla próbki badanej o objętości $20 \text{ ml} > 50 \text{ mg/l}$.

Cząsteczkowy dwutlenek siarki

Procentowy udział cząsteczkowego dwutlenku siarki H_2SO_3 w wolnym dwutlenku siarki oblicza się jako funkcję pH, zawartości alkoholu i temperatury.

Dla danej temperatury i zawartości alkoholu:



$$[\text{H}_2\text{SO}_3] = \frac{L}{10^{\text{pH}} \rho K_M^{+1}} \quad (1)$$

gdzie:

$$\rho K_M = \rho K_T - \frac{A\sqrt{I}}{1 + B\sqrt{I}}$$

$$L = [\text{H}_2\text{SO}_3] + [\text{HSO}_3^-],$$

gdzie:

- I — oznacza siłę jonową,
- A — oznacza współczynnik zależny od temperatury,
- B — oznacza współczynnik zależny od zawartości alkoholu,
- K_T — oznacza termodynamiczną stałą dysocjacji — wartości K_T dla różnej temperatury i różnej mocy alkoholowej są podane w tabeli 1,
- K_M — oznacza mieszaną stałą dysocjacji.

Dla średniej wartości siły jonowej $I = 0,038$ w tabeli 2 jest podana wartość pK_M dla różnej temperatury i zawartości alkoholu. Zawartość cząsteczkowego dwutlenku siarki obliczona na podstawie wzoru (1) jest podana w tabeli 3 dla różnej wartości pH, temperatury i zawartości alkoholu.

Obliczanie wyniku oznaczania

W tabeli 3 jest podana procentowa zawartość cząsteczkowego dwutlenku siarki (X) dla temperatu-

ry T °C obliczona na podstawie znanej wartości pH wina i zawartości alkoholu.

Zawartość cząsteczkowego dwutlenku siarki w mg/l wynosi:

$$X \times C,$$

gdzie C — oznacza zawartość wolnego dwutlenku siarki w mg/l.

TABELA 1

Wartości termodynamicznej stałej dysocjacji pK_T

| Zawartość alkoholu (% obj.) | Temperatura (°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 |

TABELA 2

Wartości mieszanej stałej dysocjacji pK_M ($I = 0,038$)

| Zawartość alkoholu (% obj.) | Temperatura (°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 |

TABELA 3

Procentowa zawartość cząsteczkowego dwutlenku siarki w stosunku do wolnego dwutlenku siarki

| Cząsteczkowy SO ₂ /wolny SO ₂ (%) | | Temperatura = 20 °C | | | | I = 0,038 |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|-------|-------|-------|-----------|
| pH | Zawartość alkoholu (% obj.) | | | | | |
| | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | |
| 2,8 | 7,73 | 9,46 | 11,55 | 14,07 | 17,09 | |
| 2,9 | 6,24 | 7,66 | 9,40 | 11,51 | 14,07 | |
| 3,0 | 5,02 | 6,18 | 7,61 | 9,36 | 11,51 | |
| 3,1 | 4,03 | 4,98 | 6,14 | 7,58 | 9,36 | |
| 3,2 | 3,22 | 3,99 | 4,94 | 6,12 | 7,58 | |
| 3,3 | 2,58 | 3,20 | 3,98 | 4,92 | 6,12 | |
| 3,4 | 2,06 | 2,56 | 3,18 | 3,95 | 4,92 | |
| 3,5 | 1,64 | 2,04 | 2,54 | 3,16 | 3,95 | |
| 3,6 | 1,31 | 1,63 | 2,03 | 2,53 | 3,16 | |
| 3,7 | 1,04 | 1,30 | 1,62 | 2,02 | 2,53 | |
| 3,8 | 0,83 | 1,03 | 1,29 | 1,61 | 2,02 | |
| Temperatura = 25 °C | | | | | | |
| 2,8 | 11,47 | 14,23 | 17,15 | 20,67 | 24,75 | |
| 2,9 | 9,58 | 11,65 | 14,12 | 17,15 | 22,71 | |
| 3,0 | 7,76 | 9,48 | 11,55 | 14,12 | 17,18 | |
| 3,1 | 6,27 | 7,68 | 9,40 | 11,55 | 14,15 | |
| 3,2 | 5,04 | 6,20 | 7,61 | 9,40 | 11,58 | |
| 3,3 | 4,05 | 4,99 | 6,14 | 7,61 | 9,42 | |
| 3,4 | 3,24 | 4,00 | 4,94 | 6,14 | 7,63 | |
| 3,5 | 2,60 | 3,20 | 3,97 | 4,94 | 6,16 | |
| 3,6 | 2,07 | 2,56 | 3,18 | 3,97 | 4,55 | |
| 3,7 | 1,65 | 2,05 | 2,54 | 3,18 | 3,98 | |
| 3,8 | 1,32 | 1,63 | 2,03 | 2,54 | 3,18 | |
| Temperatura = 30 °C | | | | | | |
| 2,8 | 18,05 | 20,83 | 24,49 | 29,28 | 35,36 | |
| 2,9 | 14,89 | 17,28 | 20,48 | 24,75 | 30,29 | |
| 3,0 | 12,20 | 14,23 | 16,98 | 20,71 | 25,66 | |
| 3,1 | 9,94 | 11,65 | 13,98 | 17,18 | 21,52 | |
| 3,2 | 8,06 | 9,48 | 11,44 | 14,15 | 17,88 | |
| 3,3 | 6,51 | 7,68 | 9,30 | 11,58 | 14,75 | |
| 3,4 | 5,24 | 6,20 | 7,53 | 9,42 | 12,08 | |
| 3,5 | 4,21 | 4,99 | 6,08 | 7,63 | 9,84 | |
| 3,6 | 3,37 | 4,00 | 4,89 | 6,16 | 7,98 | |
| 3,7 | 2,69 | 3,21 | 3,92 | 4,95 | 6,44 | |
| 3,8 | 2,16 | 2,56 | 3,14 | 3,98 | 5,19 | |
| Temperatura = 35 °C | | | | | | |
| 2,8 | 22,27 | 24,75 | 28,71 | 34,42 | 42,18 | |
| 2,9 | 18,53 | 20,71 | 24,24 | 29,42 | 36,69 | |
| 3,0 | 15,31 | 17,18 | 20,26 | 24,88 | 31,52 | |
| 3,1 | 12,55 | 14,15 | 16,79 | 20,83 | 26,77 | |
| 3,2 | 10,24 | 11,58 | 13,82 | 17,28 | 22,51 | |
| 3,3 | 8,31 | 9,42 | 11,30 | 14,23 | 18,74 | |
| 3,4 | 6,71 | 7,63 | 9,19 | 11,65 | 15,49 | |
| 3,5 | 5,44 | 6,16 | 7,44 | 9,48 | 12,71 | |
| 3,6 | 4,34 | 4,95 | 6,00 | 7,68 | 10,36 | |
| 3,7 | 3,48 | 3,98 | 4,88 | 6,20 | 8,41 | |
| 3,8 | 2,78 | 3,18 | 3,87 | 4,99 | 6,80 | |
| Temperatura = 40 °C | | | | | | |
| 2,8 | 29,23 | 30,68 | 34,52 | 40,89 | 50,14 | |
| 2,9 | 24,70 | 26,01 | 29,52 | 35,47 | 44,74 | |
| 3,0 | 20,67 | 21,83 | 24,96 | 30,39 | 38,85 | |
| 3,1 | 17,15 | 18,16 | 20,90 | 25,75 | 33,54 | |
| 3,2 | 14,12 | 14,98 | 17,35 | 21,60 | 28,62 | |
| 3,3 | 11,55 | 12,28 | 14,29 | 17,96 | 24,15 | |
| 3,4 | 9,40 | 10,00 | 11,70 | 14,81 | 20,19 | |
| 3,5 | 7,61 | 8,11 | 9,52 | 12,13 | 16,73 | |
| 3,6 | 6,14 | 6,56 | 7,71 | 9,88 | 13,77 | |
| 3,7 | 4,94 | 5,28 | 6,22 | 8,01 | 11,25 | |
| 3,8 | 3,97 | 4,24 | 5,01 | 6,47 | 9,15 | |

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SODU

Zawartość sodu oznacza się bezpośrednio w winie metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej po dodaniu chlorku cezu (CsCl) w celu przeciwdziałania jonizacji sodu.

1. ODCZYNNIKI

- 1) roztwór zawierający 1 g sodu w litrze:
używa się wzorcowego roztworu sporządzonego przez rozpuszczenie 2,542 g bezwodnego chlorku sodu (NaCl) w wodzie destylowanej do objętości 1 litra; sporządzony roztwór przechowuje się w butelce z polietylenu;
- 2) matryca — roztwór modelowy sporządza się, dodając:
 - a) 3,5 g kwasu cytrynowego ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$),
 - b) 1,5 g sacharozy ($C_{12}H_{22}O_{11}$),
 - c) 5,0 g glicerolu ($C_3H_8O_3$),
 - d) 50 mg bezwodnego chlorku wapnia ($CaCl_2$),
 - e) 50 mg bezwodnego chlorku magnezu ($MgCl_2$),
 - f) 50 ml alkoholu bezwodnego (C_2H_5OH),
— uzupełniając wodą zdemineralizowaną do 500 ml;
- 3) roztwór chlorku cezu zawierający 5 % cezu sporządza się, rozpuszczając 6,330 g chlorku cezu (CsCl) w 100 ml wody destylowanej.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w palnik powietrzno-acetylenowy;
- 2) lampa sodowa z katodą wnątkową.

3. WYKONANIE OZNACZANIA*Przygotowanie próbki*

Pipetą przenosi się 2,5 ml wina do kolby miarowej o pojemności 50 ml, następnie dodaje się 1 ml roztworu chlorku cezu i uzupełnia się do 50 ml wodą destylowaną.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do każdej z pięciu kolb miarowych o pojemności 100 ml przenosi się 5,0 ml roztworu matrycy i dodaje się odpowiednio 0 ml; 2,5 ml; 5,0 ml; 7,5 ml i 10,0 ml roztworu sodu o stężeniu 1 g/l, rozcieńczonego uprzednio w stosunku 1:100. Następnie do każdej kolby dodaje się 2 ml roztworu chlorku cezu i uzupełnia się do 100 ml wodą destylowaną.

Przygotowane w ten sposób roztwory wzorcowe zawierają odpowiednio 0 mg; 0,25 mg; 0,50 mg; 0,75 mg i 1,00 mg sodu na litr i 1 g cezu w litrze. Roztwory przechowuje się w butelkach z polietylenu.

Oznaczanie

Długość fali świetlnej ustawia się na 589,0 nm, następnie ustawia się zero na skali absorbancji, stosując roztwór wzorcowy zawierający 1 g cezu w litrze, bez zawartości sodu. Do palnika spektrofotometru wprowadza się bezpośrednio przygotowaną wcześniej próbkę rozcieńczonego wina, a następnie sporządzone wcześniej roztwory wzorcowe, i odczytuje się absorbancję. Pomiaru się powtarza.

Obliczanie wyniku oznaczania

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorbancję, c — oznacza zawartość sodu w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorbancji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) sodu w miligramach na litr.

Zawartość sodu w miligramach na litr wina wynosi $20 \times C$ i jest wyrażana w zaokrągleniu do liczby całkowitej.

4. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania powtarzalność (r) wynosi:

$$r = 1 + 0,024 x_i \text{ (mg/l)},$$

gdzie:

x_i — oznacza zawartość sodu w próbce w mg/l.

5. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania odtwarzalność (R) wynosi:

$$R = 2,5 + 0,05 x_i \text{ (mg/l)},$$

gdzie:

x_i — oznacza zawartość sodu w próbce w mg/l.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI POTASU

Zawartość potasu oznacza się bezpośrednio w winie metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej, dodając chlorku cezu (CsCl) w celu przeciwdziałania jonizacji potasu.

1. ODCZYNNIKI

- 1) roztwór zawierający 1 g potasu w litrze:
używa się wzorcowego roztworu zawierającego 1 g potasu w litrze albo sporządza się roztwór, rozpuszczając 4,813 g wodorowinianu potasowego ($C_4H_5KO_6$) w wodzie destylowanej i uzupełniając wodą destylowaną do objętości 1 litra;
- 2) matryca — roztwór modelowy sporządza się, dodając:
 - a) 3,5 g kwasu cytrynowego ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$),
 - b) 1,5 g sacharozy ($C_{12}H_{22}O_{11}$),
 - c) 5,0 g glicerolu ($C_3H_8O_3$),
 - d) 50 mg bezwodnego chlorku wapnia ($CaCl_2$),
 - e) 50 mg bezwodnego chlorku magnezu ($MgCl_2$),
 - f) 50 ml alkoholu bezwodnego (C_2H_5OH),
— uzupełniając wodą do 500 ml;
- 3) roztwór chlorku cezu zawierający 5 % cezu sporządza się, rozpuszczając 6,33 g chlorku cezu (CsCl) w 100 ml wody destylowanej.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w palnik powietrzno-acetylenowy;
- 2) lampa potasowa z katodą wnękową.

3. WYKONANIE OZNACZANIA*Przygotowanie próbki*

Do kolby miarowej o pojemności 50 ml przenosi się pipetą 2,5 ml wina (rozcieńczonego uprzednio wodą w stosunku 1:10), następnie dodaje się 1 ml roztworu chlorku cezu i uzupełnia wodą destylowaną do 50 ml.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do każdej z pięciu kolb miarowych o pojemności 100 ml przenosi się 5,0 ml roztworu modelowego (matryca) i dodaje się odpowiednio 0 ml; 2,0; 4,0 ml; 6,0 ml i 8,0 ml roztworu potasu o stężeniu 1 g/l (rozcieńczonego uprzednio w stosunku 1:10). Następnie do każdej kolby dodaje się 2 ml roztworu chlorku cezu i uzupełnia wodą destylowaną do 100 ml.

Przygotowane w ten sposób roztwory wzorcowe zawierają odpowiednio 1 g cezu w litrze oraz 2 mg, 4 mg, 6 mg i 8 mg potasu na litr, a piąty roztwór wzorcowy nie zawiera potasu. Roztwory przechowuje się w butelkach z polietylenu.

Oznaczanie

Długość fali ustawia się na 769,9 nm, następnie ustawia się zero na skali absorbancji, stosując roztwór wzorcowy zawierający 1 g cezu w litrze, bez zawartości sodu. Do palnika spektrofotometru absorpcji atomowej wprowadza się próbkę bezpośrednio rozcieńczonego wina, a następnie roztwory wzorcowe. Oznaczanie kończy się odczytaniem absorbancji. Wszystkie pomiary powtarza się dwa razy.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorbancję, c — oznacza zawartość potasu w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorbancji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) potasu w miligramach na litr.

Zawartość potasu w miligramach na litr wina, wyrażana w zaokrągleniu do liczby całkowitej, wynosi $F \times C$, gdzie F jest współczynnikiem rozcieńczenia (w tym przypadku 200).

Możliwe jest wyrażenie wyniku w:

- miligramorównoważnikach na litr: $0,0256 \times F \times C$ albo
- miligramach wodorowinianu potasu na litr: $4,813 \times F \times C$.

4. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania powtarzalność (r) wynosi: 35 mg/l.

5. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania odtwarzalność (R) wynosi: 66 mg/l.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI MAGNEZU

Zawartość magnezu oznacza się bezpośrednio w odpowiednio rozcieńczonym winie metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej.

1. ODCZYNNIKI

- 1) stężony roztwór wzorcowy zawierający 1 g magnezu w litrze; używa się wzorcowego roztworu magnezu zawierającego 1 g/l albo sporządza się roztwór, rozpuszczając 8,3646 g chlorku magnezu ($MgCl_2 \cdot 6 H_2O$) w wodzie destylowanej, uzupełniając wodą destylowaną do objętości 1 litra;
- 2) rozcieńczony roztwór wzorcowy zawierający 5 mg magnezu w litrze; wzorcowe roztwory magnezu przechowuje się w butelkach z polietylenu.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w palnik powietrzno-acetylenowy;
- 2) lampa magnezowa z katodą wnątkową.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Przygotowanie próbek

Wino rozcieńcza się wodą destylowaną w stosunku 1:100.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do każdej z czterech kolb miarowych o pojemności 100 ml przenosi się odpowiednio 5 ml, 10 ml, 15 ml i 20 ml rozcieńczonego wzorcowego roztworu magnezu i uzupełnia do 100 ml wodą destylowaną. Przygotowane w ten sposób roztwory wzorcowe zawierają odpowiednio 0,25 mg; 0,50 mg; 0,75 mg i 1,0 mg magnezu na litr. Roztwory przechowuje się w butelkach z polietylenu.

Oznaczanie

Długość fali świetlnej ustawia się na 285 nm. Zero ustawia się na skali absorbancji, stosując wodę destylowaną. Do palnika spektrofotometru absorpcji atomowej

wprowadza się bezpośrednio rozcieńczone wino, a następnie sporządzone roztwory wzorcowe.

Następnie odczytuje się absorbancję i powtarza wszystkie pomiary dwa razy.

4. WYRAŻANIE WYNIKU

Sposób obliczania

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A – oznacza absorbancję, c – oznacza zawartość magnezu w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorbancji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) magnezu w miligramach na litr.

Zawartość magnezu w miligramach na litr wina jest wyrażana w zaokrągleniu do liczby całkowitej i wynosi $100 \times C$.

5. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania powtarzalność (r) wynosi 3 mg/l.

6. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania odtwarzalność (R) wynosi 8 mg/l.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WAPNIA

Zawartość wapnia oznacza się metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej bezpośrednio w odpowiednio rozcieńczonym winie, dodając czynnik zmniejszający jonizację.

1. ODCZYNNIKI

- 1) roztwór wzorcowy zawierający 1 g wapnia w litrze: używa się wzorcowego roztworu wapnia o stężeniu 1 g/l albo sporządza się roztwór, rozpuszczając 2,5 g węglanu wapnia (CaCO_3) w kwasie chlorowodorowym (HCl) rozcieńczonym w stosunku 1:10 obj., w ilości pozwalającej na całkowite rozpuszczenie węglanu, i uzupełnia do objętości 1 litra wodą destylowaną;
- 2) rozcieńczony roztwór wzorcowy wapnia zawierający 50 mg wapnia w litrze przechowuje się w butelkach z polietylenu;
- 3) roztwór chlorku lantanu zawierający 50 g lantanu w litrze sporządza się, rozpuszczając 13,369 g chlorku lantanu ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) w wodzie destylowanej i dodając 1 ml HCl rozcieńczonego w stosunku 1:10 obj., i uzupełnia do 100 ml wodą destylowaną.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w palnik powietrzno-acetylenowy;
- 2) lampa wapniowa z katodą węgkową;
- 3) kolby miarowe.

3. WYKONANIE OZNACZANIA*Przygotowanie próbek*

Do kolby miarowej na 20 ml przenosi się 1 ml wina, 2 ml roztworu chlorku lantanu i uzupełnia wodą do 20 ml. Próbka wina, rozcieńczonego w stosunku 1:20, zawiera 5 g lantanu w litrze.

W przypadku win słodkich stężenie 5 g lantanu w litrze jest wystarczające, o ile w wyniku rozcieńczania zawartość cukrów nie spadnie poniżej 2,5 g na litr. W przypadku win o większym stężeniu cukrów zwiększa się stężenie lantanu do 10 g na litr.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do każdej z pięciu kolb miarowych na 100 ml przenosi się odpowiednio 0 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml i 20 ml rozcieńczonego wzorcowego roztworu wapnia, dodaje się 10 ml roztworu lantanu i uzupełnia do 100 ml wodą destylowaną. Przygotowane w ten sposób roztwory wzorcowe zawierają odpowiednio 0; 0,25; 5,0; 7,5; 10 mg wapnia na litr, każdy roztwór zawiera 5 g lantanu na litr. Roztwory przechowuje się w butelkach z polietylenu.

Oznaczenie

Długość fali ustawia się na 422,7 nm. Zero na skali absorbancji ustawia się, stosując roztwór zawierający 5 g lantanu na litr (przygotowanie roztworów wzorcowych). Do palnika spektrofotometru absorpcji atomowej wprowadza się bezpośrednio rozcieńczone wino, a następnie kolejno pięć roztworów wzorcowych sporządzonych w podany sposób. Odczytuje się absorbancję i powtarza wszystkie pomiary dwa razy.

4. WYRAŻANIE WYNIKU*Sposób obliczania*

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorbancję, c — oznacza zawartość sodu w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorbancji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) wapnia w miligramach na litr.

Zawartość wapnia w miligramach na litr wina wynosi $20 \times C$ i jest wyrażana w zaokrągleniu do liczby całkowitej.

5. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania powtarzalność (r) wynosi:

- 1) przy stężeniu < 60 mg/l: $r = 2,7$ mg/l;
- 2) przy stężeniu > 60 mg/l: $r = 4$ mg/l.

6. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania odtwarzalność (R) wynosi $0,114 x_i - 0,5$,

gdzie:

x_i — oznacza zawartość wapnia w próbce w mg/l.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ŻELAZA

Po odpowiednim rozcieńczeniu wina i usunięciu alkoholu zawartość żelaza oznacza się bezpośrednio metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej.

1. ODCZYNNIKI

- 1) stężony roztwór żelaza zawierający jeden gram Fe (III) w litrze;

używa się wzorcowego handlowego roztworu żelaza (1 g/l) albo sporządza się roztwór, rozpuszczając 8,6341 g siarczanu aminożelaza(III) ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) w wodzie destylowanej lekko zakwaszonej jednomolowym kwasem chlorowodorowym, i uzupełnia do 1 litra;

- 2) rozcieńczony roztwór żelaza zawierający 100 mg żelaza w litrze.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) wyparka rotacyjna z łaźnią wodną z termostatem;
- 2) spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w palnik powietrzno-acetylenowy;
- 3) lampa żelazowa z katodą węgłową;
- 4) kolby miarowe.

3. WYKONANIE OZNACZANIA*Przygotowanie próbki*

Alkohol usuwa się z wina, zmniejszając objętość próbki o połowę za pomocą wyparki rotacyjnej (temperatura od 50 do 60 °C). Następnie uzupełnia się do początkowej objętości wodą destylowaną.

Jeżeli potrzeba, próbkę rozcieńcza się przed oznaczeniem, podając współczynnik rozcieńczenia (F).

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do każdej z pięciu kolb miarowych na 100 ml przenosi się odpowiednio 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml i 5 ml roztworu żelaza o stężeniu 100 mg na litr i uzupełnia do 100 ml wodą destylowaną. Przygotowane w ten sposób roztwory wzorcowe zawierają odpowiednio 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg i 5 mg żelaza w litrze. Roztwory przechowuje się w butelkach z polietylenu.

Oznaczanie

Długość fali świetlnej ustawia się na 248,3 nm. Zero na skali absorbancji spektrofotometru ustawia się w stosunku do wody destylowanej. Do palnika spektrofotometru wprowadza się bezpośrednio rozcieńczoną próbkę, a następnie kolejno pięć roztworów wzorcowych. Odczytuje się absorbancję i powtarza wszystkie pomiary.

4. WYRAŻANIE WYNIKU*Obliczanie wyniku oznaczenia*

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorbancję, c — oznacza zawartość żelaza w roztworach wzorcowych w mg/l. Dla wartości absorbancji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) żelaza w miligramach na litr. Zawartość żelaza w miligramach na litr wina, wyrażana w zaokrągleniu do liczby całkowitej, wynosi $F \times C$, gdzie F — jest współczynnikiem rozcieńczenia.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI MIEDZI

Metoda opiera się na zastosowaniu spektrofotometrii absorpcji atomowej.

1. ODCZYNNIKI

- 1) miedź metaliczna;
- 2) kwas azotowy (HNO_3) o stężeniu 65 % (o gęstości $\rho_{20} = 1,38 \text{ g/ml}$);
- 3) kwas azotowy rozcieńczony w stosunku 1:2 obj.;
- 4) roztwór zawierający miedź w stężeniu 1 g/l — używa się wzorcowego handlowego roztworu miedzi albo roztwór ten sporządza się, odważając 1,000 g metalicznej miedzi i przenosząc ją bez strat do kolby mia-

rowej na 1000 ml. Dodaje się kwas azotowy rozcieńczony w stosunku 1:2 obj. w ilości wystarczającej do rozpuszczenia metalu, następnie dodaje się 10 ml stężonego kwasu azotowego i uzupełnia do 1000 ml wodą destylowaną;

- 5) roztwór zawierający miedź w stężeniu 100 mg/l sporządza się, przenosząc 10 ml roztworu przygotowanego do kolby miarowej na 100 ml, i uzupełnia do 100 ml wodą redestylowaną.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) naczynko platynowe;
- 2) spektrofotometr absorpcji atomowej;

- 3) lampa miedziowa z katodą węgłową;
- 4) sprzęt do doprowadzania gazu o składzie: powietrze-acetylen albo podtlenek azotu-acetylen;
- 5) kolby miarowe.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Przygotowanie próbki i oznaczanie zawartości miedzi

Jeżeli potrzeba, sporządza się odpowiednio rozcieńczony roztwór, używając wody redestylowanej.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do trzech kolb miarowych na 100 ml przenosi się odpowiednio 0,5 ml, 1 ml i 2 ml roztworu miedzi (100 mg miedzi w litrze) i uzupełnia wodą redestylowaną; przygotowane w ten sposób roztwory zawierają odpowiednio 0,5 mg, 1 mg i 2 mg miedzi w litrze.

Pomiary absorbancji wykonuje się przy 324,8 nm.

Na skali spektrofotometru absorbancji atomowej ustawia się zero dla wody redestylowanej. Wykonuje się kolejno bezpośrednie pomiary absorbancji roztworów wzorcowych przygotowanych w opisany sposób, następnie wykonuje się dwa równoległe oznaczenia.

4. WYRAŻANIE WYNIKU

Obliczanie wyniku oznaczenia

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorbancję, c — oznacza zawartość miedzi w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorbancji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) miedzi w miligramach na litr.

Jeżeli F jest współczynnikiem rozcieńczenia, zawartość miedzi, podawana w miligramach na litr z dokładnością do dwóch znaków po przecinku, wynosi $F \times C$.

Stężenia roztworów do wyznaczania krzywej wzorcowej i rozcieńczenie próbki dobiera się właściwie do czułości używanego spektrofotometru absorbancji atomowej oraz do zawartości miedzi w badanej próbce.

Jeżeli w badanej próbce oczekiwana zawartość miedzi jest bardzo mała, postępuje się następująco: w naczynku platynowym umieszcza się 100 ml próbki i odparowuje na łaźni wodnej o temperaturze 100 °C do konsystencji syropu. Następnie dodaje się po kropli 2,5 ml kwasu azotowego o stężeniu 65 %, całkowicie pokrywając cieczą dno naczynka. Ostrożnie spopiela się pozostałość na elektrycznej płytce grzejnej lub w niskim płomieniu palnika, a następnie wkłada naczynko do pieca muflowego o temperaturze 500 ± 25 °C i pozostawia na około jedną godzinę. Po wystudzeniu popiół zwilża się 1 ml kwasu azotowego o stężeniu 65 %, rozkruszając próbkę szklaną bagietką, pozostawia mieszaninę do odparowania i spopiela jak uprzednio. Ponownie umieszcza się naczynko w piecu muflowym na 15 minut. Obróbkę kwasem azotowym powtarza się co najmniej trzykrotnie. Popiół rozpuszcza się, dodając do naczynka 1 ml kwasu azotowego o stężeniu 65 % oraz 2 ml wody redestylowanej, i przenosi do kolby na 10 ml. Naczynko przemywa się trzykrotnie, za każdym razem używając 2 ml wody redestylowanej. Następnie dodaje się wody redestylowanej do 10 ml.

Załącznik nr 32

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KADMU

Zawartość kadmu oznacza się bezpośrednio w winie metodą bezpłomieniowej spektrofotometrii absorpcji atomowej.

1. ODCZYNNIKI

Stosuje się wodę dwukrotnie destylowaną w aparacie ze szkła borokrzemowego, dopuszcza się użycie wody o podobnej czystości. Wszystkie odczynniki mają czystość analityczną i nie zawierają kadmu:

- 1) 85 % kwas fosforowy (o gęstości $\rho_{20} = 1,71$ g/ml);
- 2) roztwór kwasu fosforowego, otrzymany przez rozcieńczenie 8 ml kwasu fosforowego wodą do 100 ml;
- 3) 0,02-molowy roztwór soli dwusodowej kwasu etylenodwuaminoczerooctowego (EDTA);
- 4) roztwór buforowy o pH 9 sporządza się, rozpuszczając w kolbie miarowej na 100 ml 5,4 g chlorku

amonu w kilku mililitrach wody, następnie dodaje się 35 ml roztworu wodorotlenku amonu (o gęstości $\rho_{20} = 0,92$ g/ml) rozcieńczonego do 25 % obj. i uzupełnia do 100 ml wodą;

- 5) czerń eriochromowa T — 1 % wagowy, sucha mieszanina z chlorkiem sodowym;
- 6) roztwór siarczanu kadmu ($\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), którego miano sprawdza się następująco: do cylindrycznego naczynia z wodą odważa się dokładnie 102,6 mg siarczanu kadmu i wstrząsa do rozpuszczenia, następnie dodaje się 5 ml roztworu buforowego o pH = 9 i około 20 mg czerni eriochromowej T — miareczkuje roztworem EDTA do zmiany barwy wskaźnika na niebieską (ilość zużytego roztworu EDTA powinna wynosić 20 ml), jeżeli zużyta objętość niewiele odbiega od 20 ml — odpowiednio koryguje się ilość siarczanu kadmu odważanego do przygotowania roztworu wzorcowego;

7) roztwór wzorcowy kadmu o stężeniu 1 g/l — używa się wzorcowego handlowego roztworu kadmu albo sporządza się roztwór, rozpuszczając 2,2820 g siarczynu kadmowego w wodzie i uzupełniając do 1 litra.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) szkło laboratoryjne przed użyciem myje się w stężonym kwasie azotowym podgrzany do temperatury od 70 do 80 °C, następnie spłukuje się wodą redestylowaną;
- 2) spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w piec grafitowy, korekcję tła i multipotencjometr;
- 3) lampa kadmowa z katodą wnękową;
- 4) mikropipety na 5 µl ze specjalnymi końcówkami do pomiarów metodą absorpcji atomowej.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Przygotowanie próbek

Wino rozcieńcza się w stosunku 1:2 obj., używając roztworu kwasu fosforowego.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Wykorzystując wzorcowy roztwór kadmu, przygotowuje się serię roztworów o stężeniach odpowiednio 2,5; 5; 10 i 15 µg kadmu w litrze.

Temperaturę pieca programuje się w następujący sposób:

- 1) suszenie w temperaturze 100 °C przez 30 sekund;

- 2) mineralizacja w temperaturze 900 °C przez 20 sekund;
- 3) atomizacja w temperaturze 2250 °C przez 2 do 3 sekund;
- 4) przepływ azotu (gaz płuczający): 6 litrów/minutę.

W celu oczyszczenia pieca temperaturę podnosi się do 2700 °C.

Pomiary metodą absorpcji atomowej

Długość fali świetlnej ustawia się na 228,8 nm. Zero ustawia się na skali absorpcji w stosunku do wody redestylowanej. Za pomocą mikropipety wprowadza się do pieca trzy 5 µl porcje każdego z roztworów wzorcowych i roztworu badanej próbki, następnie odczytuje się wartości absorpcji. Wartość średnią absorpcji oblicza się na podstawie pomiarów trzech wprowadzonych porcji.

4. WYRAŻANIE WYNIKU

Obliczanie wyniku oznaczenia

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorpcję, c — oznacza zawartość kadmu w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorpcji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) kadmu w miligramach na litr.

Zawartość kadmu w mikrogramach na litr wina wynosi: $2 \times C$.

Załącznik nr 33

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SREBRA

Metoda oparta jest na zastosowaniu spektrofotometrii absorpcji atomowej po spopieleniu próbki.

1. ODCZYNNIKI

- 1) azotan srebra (AgNO_3);
- 2) kwas azotowy (HNO_3), o stężeniu 65 % i gęstości $\rho_{20} = 1,38$ g/ml;
- 3) kwas azotowy rozcieńczony w stosunku 1:10 obj.;
- 4) roztwór zawierający 1 g srebra w litrze: używa się wzorcowego handlowego roztworu srebra albo sporządza się roztwór, rozpuszczając 1,575 g azotanu srebra w rozcieńczonym kwasie azotowym i uzupełniając do 1000 ml rozcieńczonym kwasem azotowym;
- 5) roztwór zawierający 10 mg srebra w litrze;

10 ml roztworu zawierającego 1 g srebra sporządzonego w opisany sposób rozcieńcza się do 1000 ml rozcieńczonym roztworem kwasu azotowego.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) naczynko platynowe;
- 2) łaźnia wodna z termostatem o temperaturze 100 °C;
- 3) piec o kontrolowanej temperaturze od 500 do 525 °C;
- 4) spektrofotometr absorpcji atomowej;
- 5) lampa srebrna z katodą wnękową;
- 6) gazy zasilające: powietrze, acetylen;
- 7) kolby miarowe.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Przygotowanie próbki

20 ml próbki umieszcza się w naczynku platynowym i odparowuje do sucha na wrzącej łaźni wodnej. Następnie spopiela się próbkę w piecu w temperaturze 500 do 525 °C. Biały popiół zwilża się za pomocą 1 ml kwasu azotowego o stężeniu 65 %. Próbkę odparowuje się na wrzącej łaźni wodnej, powtórnie dodaje 1 ml kwasu azotowego o stężeniu 65 % i odparowuje po raz drugi. Następnie dodaje się 5 ml rozcieńczonego kwasu azotowego w stosunku 1:10 obj. i lekko ogrzewa do rozpuszczenia.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do sześciu kolb miarowych na 100 ml odmierza się pipetą odpowiednio 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml oraz 20 ml roztworu zawierającego 10 mg srebra w litrze i uzupełnia do 100 ml rozcieńczonym kwasem azotowym w stosunku 1:10 obj. Przygotowane w ten sposób roztwory zawierają odpowiednio 0,20 mg, 0,40 mg, 0,60 mg, 0,80 mg, 1,0 mg i 2,0 mg srebra w litrze.

Długość fali świetlnej ustawia się na 328,1 nm. Zero ustawia się na skali spektrofotometru absorpcji atomowej w stosunku do wody redestylowanej. Wykonuje się kolejno bezpośrednie pomiary absorpcji roztworów wzorcowych. Wykonuje się dwa równoległe oznaczenia.

4. WYRAŻANIE WYNIKU

Obliczanie wyniku oznaczenia

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorpcję, c — oznacza zawartość srebra w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorpcji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) srebra w miligramach na litr.

Zawartość srebra w winie w miligramach na litr wynosi $0,25 \times C$. Wartość ta jest podawana z dokładnością do dwóch znaków po przecinku.

Załącznik nr 34

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CYNKU

Po usunięciu alkoholu zawartość cynku jest oznaczana bezpośrednio w winie metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej.

1. ODCZYNNIKI

Stosuje się wodę redestylowaną w aparacie ze szkła borokrzemowego. Jest możliwe użycie wody o podobnym wskaźniku czystości.

- 1) wzorcowy roztwór cynku zawierający jeden gram cynku w litrze:

używa się wzorcowego handlowego roztworu cynku lub sporządza się roztwór, rozpuszczając 4,3975 g siarczanu cynku ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$) w wodzie i uzupełniając do objętości 1 litra;

- 2) rozcieńczony roztwór wzorcowy zawierający 100 mg cynku w litrze.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) wyparka rotacyjna z łaźnią wodną z termostatem;
- 2) spektrofotometr absorpcji atomowej z palnikiem powietrzno-acetylenowym;
- 3) lampa cynkowa z katodą wnękową.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Przygotowanie próbki

Za pomocą wyparki rotacyjnej (temperatura od 50 do 60 °C) usuwa się alkohol ze 100 ml wina, zmniejszając ob-

jętość próbki do połowy. Następnie uzupełnia się do pierwotnej objętości 100 ml za pomocą wody redestylowanej.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do czterech kolb miarowych na 100 ml odmierza się odpowiednio 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml i 2 ml roztworu zawierającego 100 mg cynku w litrze i uzupełnia wodą redestylowaną do 100 ml. Przygotowane w ten sposób roztwory zawierają odpowiednio 0,5 mg, 1 mg, 1,5 mg i 2 mg cynku w litrze.

Oznaczenie

Długość fali świetlnej ustawia się na 213,9 nm. Zero ustawia się na skali absorpcji w stosunku do wody redestylowanej. Do palnika spektrofotometru absorpcji atomowej wprowadza się bezpośrednio wino, a następnie kolejno cztery roztwory wzorcowe. Następnie odczytuje się absorpcję. Wykonuje się dwa równoległe oznaczenia.

4. WYRAŻANIE WYNIKU

Obliczanie wyniku oznaczenia

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorpcję, c — oznacza zawartość cynku w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorpcji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) cynku w miligramach na litr.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI OŁOWIU

Zawartość ołowiu oznacza się bezpośrednio w winie metodą bezplamieniowej spektrofotometrii absorpcji atomowej.

1. ODCZYNNIKI

Stosuje się wodę redestylowaną w aparacie ze szkła borokrzemowego, dopuszcza się użycie wody o podobnej czystości. Wszystkie odczynniki są czystości analitycznej i nie zawierają ołowiu.

- 1) 85 % kwas fosforowy o gęstości $\rho_{20} = 1,71$ g/ml;
- 2) roztwór kwasu fosforowego otrzymany przez rozcieńczenie 8 ml kwasu fosforowego wodą do 100 ml;
- 3) kwas azotowy o gęstości $\rho_{20} = 1,38$ g/ml;
- 4) roztwór ołowiu o stężeniu 1 g w litrze — używa się wzorcowego handlowego roztworu ołowiu albo sporządza się taki roztwór, rozpuszczając 1,600 g azotanu ołowiu(II) $Pb(NO_3)_2$ w kwasie azotowym rozcieńczonym do 1 % obj. i uzupełniając do 1 litra. Tak przygotowany roztwór przechowuje się w butelce ze szkła borokrzemowego z korkiem na szlif.

2. APARATURA I SPRZĘT

Szkło laboratoryjne przed użyciem myje się w stężonym kwasie azotowym podgrzanym do temperatury od 70 do 80 °C i spłukuje wodą redestylowaną.

- 1) spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w piec grafitowy, niespecyficzną korekcję absorpcji i multipotencjometr;
- 2) lampa ołowiowa z katodą wnątkową;
- 3) mikropipety na 5 μ l z końcówkami do pomiarów metodą absorpcji atomowej.

3. WYKONANIE OZNACZANIA*Przygotowanie próbki*

Wino rozcieńcza się w stosunku 1:2 lub 1:3 roztworem kwasu fosforowego, zależnie od oczekiwanej zawartości ołowiu określając współczynnik rozcieńczenia (F).

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Przygotowuje się serię roztworów, o stężeniach odpowiednio 2,5 μ g; 5 μ g; 10 μ g i 15 μ g ołowiu w litrze, przez rozcieńczanie wodą redestylowaną wzorcowego roztworu ołowiu.

Programowanie temperatury pieca przeprowadza się w następujący sposób:

- 1) suszenie w temperaturze 100 °C do 30 sekund;
- 2) mineralizacja w temperaturze 900 °C do 20 sekund;
- 3) atomizacja w temperaturze 2250 °C od 2 do 3 sekund;
- 4) przepływ azotu (gaz płuczający): 6 litrów/minutę.

W celu oczyszczenia pieca temperaturę podnosi się do 2700 °C.

Pomiary

Długość fali świetlnej ustawia się na 217 nm, zero ustawia się na skali absorbancji w stosunku do wody redestylowanej. Za pomocą mikropipety wprowadza się do pieca, o zaprogramowanej temperaturze, trzy 5 μ l porcje każdego z roztworów do kalibracji i roztworu badanej próbki. Odczytuje się wartości absorbancji, następnie oblicza się średnią wartość absorbancji na podstawie wyników pomiaru trzech porcji.

4. WYRAŻANIE WYNIKU*Obliczanie wyniku oznaczenia*

Sporządza się wykres w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorbancję, c — oznacza zawartość ołowiu w roztworach wzorcowych w mg/l.

Dla wartości absorbancji uzyskanej dla próbki rozcieńczonego wina odczytuje się z wykresu zawartość (C) ołowiu w miligramach na litr.

Zawartość ołowiu w winie w miligramach na litr wynosi:

$$C \times F,$$

gdzie F — oznacza współczynnik rozcieńczenia.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI FLUORKÓW

Zawartość fluorków w winie, wprowadzonych do roztworu buforowego, jest oznaczana za pomocą elektrody selektywnej z membraną stałą. Zmierzony za pomocą elektrody potencjał jest proporcjonalny do logarytmu aktywności jonów fluorkowych w badanym środowisku, zgodnie z równaniem:

$$E = E_0 \pm S \log a_F,$$

gdzie:

E — oznacza potencjał elektrody jonoselektywnej mierzony w stosunku do elektrody odniesienia w badanym środowisku,

E_0 — oznacza standardowy potencjał czujnika pomiarowego,

S — oznacza nachylenie elektrody jonoselektywnej (współczynnik Nernsta). W temperaturze 25 °C teoretyczne nachylenie wynosi 59,2 mV,

a_F — oznacza aktywność jonów fluorkowych w badanym roztworze.

1. ODCZYNNIKI

- 1) roztwór podstawowy fluorku o stężeniu 1 g/l — używa się wzorcowego handlowego roztworu o stężeniu 1 g/l albo roztwór ten sporządza się, rozpuszczając 2,210 g fluorku sodowego (suszonego od 3 do 4 godzin w temperaturze 105 °C) w wodzie destylowanej, następnie uzupełnia się wodą destylowaną do 1 litra;
- 2) wzorcowe roztwory fluorku o odpowiednim stężeniu w mg/l sporządza się przez rozcieńczanie roztworu podstawowego wodą destylowaną i przechowuje w butelce z tworzywa sztucznego. Roztwory wzorcowe przygotowuje się na potrzeby bieżące;
- 3) roztwór buforowy o pH 5,5 — 10 g kwasu trans-1,2-dwuaminocykloheksanocteroctowego (CDTA) wprowadza się do wody (około 50 ml); dodaje się 58 g chlorku sodu i 29,4 g cytrynianu trójsodowego w 700 ml wody destylowanej. CDTA rozpuszcza się po dodaniu około 6 ml 32 % (m/v) roztworu wodorotlenku sodu, na koniec dodaje się 57 ml kwasu octowego o stężeniu $\rho_{20} = 1,05$ g/ml i doprowadza pH do 5,5 za pomocą 32 % roztworu wodorotlenku sodowego (około 45 ml). Tak sporządzony roztwór pozostawia się do ostygnięcia i uzupełnia do 1 litra wodą destylowaną.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) elektroda z membraną krystaliczną selektywna w stosunku do jonów fluorkowych;
- 2) elektroda odniesienia (kalomelowa lub Ag/AgCl);

- 3) miliwoltomierz (pehametr z rozszerzoną skalą miliwoltową) o dokładności odczytu 0,1 mV;
- 4) mieszadło magnetyczne z płytką izolacyjną, chroniącą badany roztwór przed ciepłem wytwarzanym przez silnik napędu mieszadła;
- 5) naczynie do mieszania roztworu zamykane pokrywką z tworzywa sztucznego (z polietylenu lub podobnego materiału);
- 6) zlewki z tworzywa sztucznego o pojemności od 30 do 50 ml i butelki z tworzywa sztucznego (z polietylenu lub podobnego materiału);
- 7) dokładne pipety (pipety skalowane w mikrolitrach lub podobne).

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Wszystkie roztwory w trakcie oznaczania mają temperaturę 25 °C (± 1 °C). Odchylenie o więcej niż 1 °C powoduje zmianę mierzonego potencjału o około 0,2 mV.

Metoda bezpośrednia

Do zlewki z tworzywa sztucznego przenosi się odmierzoną ilość wina i taką samą objętość roztworu buforowego.

Roztwór miesza się w sposób równomierny i łagodny. Gdy wskazówka miliwoltomierza ustabilizuje się (stabilność jest osiągnięta, gdy wahania potencjału nie przekraczają 0,2 do 0,3 mV w ciągu trzech minut), odczytuje się wartość potencjału w mV.

Metoda dodawania znanych ilości fluorku

Do badanej próbki dodaje się za pomocą mikropipety, przy ciągłym mieszaniu, znaną objętość wzorcowego roztworu fluorku. Gdy wskazówka miliwoltomierza ustabilizuje się, odczytuje się wartość potencjału w mV.

Stężenie dodawanego roztworu wzorcowego ustala się w następujący sposób:

- 1) dwukrotnie lub trzykrotnie zwiększa się stężenie fluorku w roztworze badanej próbki;
- 2) dopuszczalny przyrost objętości roztworu badanej próbki co najwyżej 1 %.

Przybliżone stężenie roztworu badanej próbki odczytuje się z krzywej wzorcowej wykreślonej na skali półlogarytmicznej za pomocą roztworów wzorcowych o stężeniu 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 i 2,0 mg/l.

Jeżeli przybliżone stężenie roztworu badanej próbki znajduje się poza zakresem stężeń roztworów wzorcowych, próbkę należy rozcieńczyć.

Obliczanie wyniku oznaczania

Zawartość fluorków (C_F) w roztworze badanej próbki w mg/l oblicza się według wzoru:

$$C_F = \frac{V_a \times C_a}{V_o} \times \frac{1}{(\text{antylog } \Delta E/S) - 1},$$

gdzie:

C_F — oznacza zawartość fluorków w roztworze badanej próbki (mg/l),

C_a — oznacza zawartość fluorków w roztworze dodanym (mg/l) do roztworu badanej próbki (V_a),

V_o — oznacza początkową objętość roztworu badanej próbki przed dodaniem roztworu fluorku (ml),

V_a — oznacza objętość roztworu badanej próbki po dodaniu roztworu fluorku (ml),

ΔE — oznacza różnicę potencjałów otrzymaną w metodzie bezpośredniej i w metodzie dodawania znanych ilości fluorku (mV),

S — oznacza nachylenie elektrody w badanym roztworze.

Jeżeli V_a jest bardzo zbliżone do V_o , stosuje się wzór:

$$C_F = C_a \times \frac{1}{(\text{antylog } \Delta E/S) - 1}.$$

Uzyskaną wartość należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia, wynikający z dodania do próbki roztworu buforowego.

Załącznik nr 37

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI DWUTLENKU WĘGLA

Wina inne niż wina musujące i gazowane (nadciśnienie wywoływane przez $\text{CO}_2 < 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$)

Przygotowanie próbki

Odmierzona objętość wina jest schładzana do temperatury około 0°C i mieszana z wodorotlenkiem sodu w ilości wystarczającej do sprowadzenia pH do wartości 10—11. Miareczkowanie wykonuje się za pomocą roztworu kwasu w obecności anhidrazy węglowej (dehydrataza węglanowa). Zawartość dwutlenku węgla oblicza się na podstawie objętości kwasu potrzebnego do zmiany pH z 8,6 (forma wodorowęglanowa) na 4,0 (kwas węglowy). W celu uwzględnienia ilości wodorotlenku sodowego związanego przez kwasy obecne w winie przeprowadza się próbę ślepą, miareczkując w tych samych warunkach wino pozbawione dwutlenku węgla.

1. ODCZYNNIKI

- 1) 0,1-molowy roztwór wodorotlenku sodu (NaOH);
- 2) 0,05-molowy roztwór kwasu siarkowego (H_2SO_4);
- 3) roztwór anhidrazy węglowej sporządzony w następujący sposób — 1 g anhidrazy węglowej rozpuszcza się w 1 litrze wody.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) mieszadło magnetyczne;
- 2) pehametr.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Wino razem z pipetą na 10 ml używaną do pobierania próbek schładza się do temperatury około 0°C .

Do zlewki na 100 ml odmierza się 25 ml 0,1-molowego roztworu wodorotlenku sodu, dodaje dwie krople wodnego roztworu anhidrazy węglowej o stężeniu g/l, a następnie za pomocą pipety schłodzonej do temperatury 0°C wprowadza się 10 ml wina.

Zlewkę umieszcza się na mieszadle magnetycznym, wkłada elektrodę pehametru i miesza z umiarkowaną prędkością.

Gdy roztwór osiągnie temperaturę pokojową, miareczkuje się powoli roztworem kwasu siarkowego do uzyskania wartości pH 8,6. Ilość użytego kwasu zapisuje się.

Kontynuuje się miareczkowanie 0,05-molowym roztworem kwasu siarkowego do uzyskania wartości pH 4,0. Ilość ml kwasu zużytego na zmianę pH z 8,6 do 4,0 — oznacza się symbolem n . Z próbki wina o objętości około 50 ml usuwa się CO_2 przez wstrząsanie pod próżnią przez 3 minuty, ogrzewając kolbę w łaźni wodnej do temperatury 25°C .

Czynności powtarza się, używając 10 ml wina pozbawionego dwutlenku węgla. Ilość ml kwasu zużytego w próbie ślepej oznacza się symbolem n' .

Obliczanie wyniku oznaczania

1 ml odmiareczkowanego 0,1-molowego wodorotlenku sodowego odpowiada $4,4 \text{ mg CO}_2$.

Zawartość CO_2 w gramach na litr wina wynosi: $0,44 \times (n - n')$.

Wartość tę podaje się z dokładnością do dwóch znaków po przecinku.

Jeżeli wino zawiera poniżej 1 g/l CO₂, nie jest konieczne dodawanie anhydryzy węglowej w celu katalizowania reakcji hydratacji CO₂.

Wina musujące i półmusujące

Przygotowanie próbek

Próbkę wina do analizy schładza się w temperaturze bliskiej temperaturze zamarzania. Po pobraniu pewnej ilości wina do wykonania próby ślepej po usunięciu dwutlenku węgla wino pozostałe w butelce alkaliczuje się w celu związania całego dwutlenku węgla w formie Na₂CO₃. Miareczkowanie wykonuje się za pomocą roztworu kwasu w obecności anhydryzy węglowej. Zawartość dwutlenku węgla oblicza się na podstawie objętości kwasu potrzebnej do zmiany pH z 8,6 (forma wodorowęglanowa) na 4,0 (kwas węglowy). W celu uwzględnienia ilości wodorotlenku sodowego związanego przez kwasy obecne w winie próbę ślepej wykonuje się, miareczkując w tych samych warunkach wino pozbawione dwutlenku węgla.

1. ODCZYNNIKI

- 1) roztwór wodorotlenku sodu (NaOH) 50 % wagowo;
- 2) 0,05-molowy roztwór kwasu siarkowego (H₂SO₄);
- 3) roztwór anhydryzy węglowej sporządzony w następujący sposób: 1 g anhydryzy węglowej rozpuszcza się w 1 litrze wody.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) cylinder miarowy;
- 2) mieszadło magnetyczne;
- 3) pehametr.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Zaznacza się poziom wina w butelce, następnie schładza się do rozpoczęcia zamarzania tego wina. Butelkę ogrzewa się lekko, stale wstrząsając do zniknięcia kryształów lodu. Szybko wyjmuje się korek i odmierza 45 do 50 ml wina do cylindra miarowego w celu wykonania próby ślepej. Dokładną ilość odmierzonego wina (v ml) odczytuje się w cylindrze miarowym po sprawdzeniu próbki do temperatury około 20 °C.

Natychmiast po pobraniu wina do próby ślepej do butelki o pojemności 750 ml dodaje się 20 ml roztworu wodorotlenku sodu (50 % obj.).

Wino pozostawia się, aż osiągnie temperaturę pokojową.

Do zlewki na 100 ml odmierza się 30 ml przegotowanej wody destylowanej i dodaje dwie krople roztworu anhydryzy węglowej (1 g/l), a następnie dodaje się

10 ml zalkalizowanego wina. Zlewkę umieszcza się na mieszadle magnetycznym, wkłada elektrodę oraz mieszadło magnetyczne i miesza się z umiarkowaną prędkością.

Miareczkuje się powoli 0,05-molowym roztworem kwasu siarkowego do osiągnięcia pH 8,6. Zapisuje się ilość zużytego roztworu kwasu.

Miareczkuje się dalej powoli 0,05-molowym roztworem kwasu siarkowego do uzyskania wartości pH 4,0.

Z próbki wina o objętości v ml, pozostawionego do wykonania próby ślepej, usuwa się CO₂ przez wstrząsanie pod próżnią przez 3 minuty, ogrzewając kolbę w łaźni wodnej do temperatury 25 °C. Pobiera się 10 ml wina pozbawionego dwutlenku węgla i dodaje 30 ml przegotowanej wody destylowanej, następnie dodaje się dwie do trzech kropli roztworu wodorotlenku sodu (50 % obj.), aby sprowadzić pH do wartości 10—11. Zlewkę umieszcza się na mieszadle magnetycznym, wkłada elektrodę oraz mieszadło magnetyczne i miesza się z umiarkowaną prędkością. Miareczkuje się powoli 0,05-molowym roztworem kwasu siarkowego do osiągnięcia pH 8,6. Zapisuje się ilość zużytego roztworu kwasu.

Miareczkuje się dalej powoli 0,05-molowym roztworem kwasu siarkowego do uzyskania wartości pH 4,0.

Obliczanie wyniku oznaczania

1 ml 0,05-molowego roztworu kwasu siarkowego odpowiada 4,4 mg CO₂.

Opróżnia się butelkę wina, które zostało zalkalizowane, i oznacza początkową objętość wina (V) z dokładnością do 1 ml przez napełnienie butelki wodą do zaznaczonej wysokości.

Zawartość CO₂ (G) w gramach na litr wina oblicza się według wzoru:

$$G = 0,44 (n - n') \times \frac{(V - v + 20)}{V - v},$$

gdzie:

- n' — oznacza ilość ml zużytego 0,5-molowego roztworu kwasu siarkowego,
- n — oznacza ilość ml kwasu zużytego na zmianę pH z 8,6 na 4,0,
- V — oznacza zmierzoną początkową objętość wina w ml,
- v — oznacza zmierzoną końcową objętość wina w ml.

Wynik podaje się z dokładnością do dwóch znaków po przecinku.

Nadciśnienie w temperaturze 20 °C ($P_{\text{aph}_{20}}$) wyrażane w paskalach oblicza się według wzoru:

$$P_{\text{aph}_{20}} = \frac{Q}{1,951 \times 10^{-5} \times (0,86 \times 0,01 A) \times (1 - 0,00144 S)} - P_{\text{atm}},$$

gdzie:

Q — oznacza zawartość CO_2 w g/l wina,
A — oznacza zawartość alkoholu w winie w temperaturze 20 °C,

S — oznacza zawartość cukrów w winie w g/l,
 P_{atm} — oznacza ciśnienie atmosferyczne, wyrażone w paskalach.

Załącznik nr 38

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI POCHODNYCH CYJANKOWYCH

Wolny kwas cyjanowodorowy jest uwalniany w wyniku hydrolizy kwasowej i wydzielany metodą destylacji. Utworzony po reakcji z chloraminą-T i pirydyną dialdehyd glutakonowy jest oznaczany kolorymetrycznie na podstawie niebieskiego zabarwienia, jakie daje z kwasem 1,3-dimetylo-barbiturowym.

1. ODCZYNNIKI

- 1) 25 % kwasu fosforowego (H_3PO_4) (m/v);
- 2) 3 % roztwór chloraminy-T ($\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNaO}_2\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (m/v);
- 3) roztwór kwasu 1,3-dimetylo-barbiturowego: rozpuszcza się 3,658 g kwasu 1,3-dimetylo-barbiturowego ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$) w 15 ml pirydyny i 3 ml kwasu solnego (o gęstości $\rho_{20} = 1,019$ g/ml) i dodaje się 50 ml wody destylowanej;
- 4) cyjanek potasu (KCN);
- 5) 10 % roztwór jodku potasu (KJ) (m/v);
- 6) 0,1-molowy roztwór azotanu srebra (AgNO_3).

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) aparatura destylacyjna; stosować aparat do destylacji do oznaczania zawartości alkoholu w winie opisany w załączniku nr 3 do rozporządzenia;
- 2) kolba okrągłodenna na 500 ml z zakończeniem na szlif;
- 3) łaźnia wodna z termostatem umożliwiającą kontrolę temperatury w 20 °C;
- 4) spektrofotometr umożliwiający pomiar absorbancji przy długości fali świetlnej 590 nm;
- 5) kuwety szklane lub jednorazowe kuwety o długości drogi optycznej 20 mm;
- 6) wyskalowane naczynie o pojemności 300 ml.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Destylacja

Do kolby o pojemności 500 ml odmierza się 25 ml wina, 50 ml wody destylowanej i 1 ml 25 % kwasu fosforowego oraz dodaje się kilka kulek szklanych. Kolbę podłącza się do aparatu do destylacji. Używa się stożkowej rurki (przedłużacz chłodnicy) doprowadzającej destylat do kolby miarowej na 50 ml zawierającej 10 ml wody. Kolbę miarową zanurza się w lodowatej wodzie. Do kolby miarowej zbiera się 30 do 35 ml destylatu (lub około 45 ml płynu w sumie).

Stożkową rurkę chłodnicy przepłukuje się kilkoma mililitrami wody destylowanej, destylat doprowadza się do temperatury 20 °C i uzupełnia się kolbę wodą destylowaną do 50 ml.

Wykonanie pomiaru

Odmierza się 25 ml destylatu do kolby stożkowej na 50 ml z zakończeniem na szlif, dodaje 1 ml 3 % roztworu chloraminy-T, a następnie kolbę zamyka się korkiem. Po dokładnie 60 s dodaje się 3 ml roztworu kwasu 1,3-dimetylo-barbiturowego, kolbę zamyka się i pozostawia na 10 minut. Następnie mierzy się absorbancję próbki i próby ślepej (25 ml wody destylowanej zamiast 25 ml destylatu) przy długości fali świetlnej 590 nm w kuwecie o długości drogi optycznej równej 20 mm.

4. WYKONANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ

Argentometryczne miareczkowanie cyjanku potasu

W wyskalowanym naczyniu o pojemności 300 ml rozpuszcza się około 0,2 g cyjanku potasu w 100 ml wody destylowanej. Dodaje się 0,2 ml 10 % roztworu jodku potasu i miareczkuje się 0,1-molowym roztworem azotanu srebra do uzyskania trwałego żółtego zabarwienia.

Przy założeniu, że 1 ml 0,1-molowego roztworu azotanu srebra ilościowo odpowiada 13,2 mg cyjanku potasu, wylicza się zawartość cyjanku potasu w próbce.

Przygotowanie roztworów wzorcowych

Mając ustaloną zawartość cyjanku potasu, przygotowuje się roztwór wzorcowy zawierający 30 mg/l kwasu cyjanowodorowego (30 mg HCN = 72,3 KCN). Rozcieńcza się w stosunku 1 do 10.

Do kolb miarowych na 100 ml odmierza się po 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml i 5,0 ml rozcieńczonej próbki i uzupełnia wodą destylowaną. Przygotowane roztwory zawierają odpowiednio po 30 µg; 60 µg; 90 µg; 120 µg i 150 µg kwasu cyjanowodorowego w litrze.

Wykreślanie krzywej wzorcowej

Do kolb stożkowych na 50 ml, z zakończeniem na szlif, pobiera się po 25 ml roztworów wzorcowych. Następnie dodaje się po 1 ml 3 % roztworu chloraminy-T, po czym kolbę zamyka się korkiem. Po dokładnie 60 s dodaje się 3 ml roztworu kwasu 1,3-dimetylo-barbiturowego, kolbę zamyka się i pozostawia na 10 minut. Następnie mierzy się absorbancję przy długości fali świetlnej 590 nm w kuwecie o długości drogi optycznej równej 20 mm. Z uzyskanych wartości absorbancji wykreśla się krzywą wzorcową w układzie $A = f(c)$, gdzie A — oznacza absorbancję roztworów wzorcowych, c — oznacza stężenie kwasu cyjanowodorowego w roztworach wzorcowych w µg/l. Krzywa wzorcowa ma postać linii prostej przechodzącej przez początek układu współrzędnych.

Obliczanie wyniku oznaczania

Zawartość kwasu cyjanowodorowego jest wyrażana w mikrogramach na litr (µg/l) z dokładnością do jedności.

Sposób wyliczenia

Odczytuje się zawartość kwasu cyjanowodorowego z krzywej wzorcowej. Jeśli próbka była rozcieńczona, uzyskany wynik mnoży się przez współczynnik rozcieńczenia.

5. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

W przypadku oznaczania powtarzalność (r) wynosi dla:

- 1) wina białego 3,1 µg/l lub w przybliżeniu 6 % x_i ;
- 2) wina czerwonego 6,4 µg/l lub w przybliżeniu 8 % x_i ,

gdzie:

- x_i — oznacza średnią zawartość HCN w winie,
 x_i — dla wina białego wynosi 48,4 µg/l,
 x_i — dla wina czerwonego wynosi 80,5 µg/l.

6. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

W przypadku oznaczania odtwarzalność (R) wynosi dla:

- 1) wina białego 12 µg/l lub w przybliżeniu 25 % x_i ;
- 2) wina czerwonego 23 µg/l lub w przybliżeniu 29 % x_i ,

gdzie:

- x_i — oznacza średnią zawartość HCN w winie,
 x_i — dla wina białego wynosi 48,4 µg/l,
 x_i — dla wina czerwonego wynosi 80,5 µg/l.

Załącznik nr 39

WYKRYWANIE OBECNOŚCI IZOTIOCYJANIANU ALLILOWEGO

Izotiocyanian allilowy obecny w winie oddestylowuje się i identyfikuje metodą chromatografii gazowej.

1. ODCZYNNIKI

- 1) etanol bezwodny;
- 2) roztwór wzorcowy izotiocyanianu allilowego w bezwodnym alkoholu sporządza się, rozpuszczając 15 mg izotiocyanianu allilowego w litrze;

- 3) mieszanina zamrażająca, składająca się z etanolu i suchego lodu (temperatura -60 °C).

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) aparat destylacyjny (przedstawiony na schemacie), przez który przepływa strumień azotu;
- 2) płaszcz grzejny z termostatem;
- 3) przepływomierz;

- 4) chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-spektrofotometrycznym, wyposażony w filtr selektywny dla związków siarkowych (długość fali = 394 nm) lub inny odpowiedni detektor;
- 5) kolumna chromatograficzna ze stali kwasoodpornej, o średnicy wewnętrznej 3 mm i długości 3 m, z fazą stacjonarną 10 % Carbowax 20M osadzoną na nośniku Chromosorb WHP, 80 do 100 mesh;
- 6) mikrostrzykawka, 10 μ l.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Do kolby destylacyjnej odmierza się 2 litry wina, do dwóch próbek odbierających dodaje się kilka mililitrów bezwodnego etanolu, tak aby porowata część rurek rozprowadzających gaz była całkowicie zakryta. Ochładza się obie próbki od zewnątrz mieszaniną zamrażającą. Łączy się kolbę z próbkami odbierającymi i rozpoczyna przepłukiwanie aparatu azotem z prędkością 3 litrów na minutę. Wino podgrzewa się do temperatury 80 °C za pomocą płaszcza grzejjego

i destyluje, zbierając 45 do 50 ml destylatu. Następnie chromatograf stabilizuje się. Zaleca się przestrzegać następujących warunków:

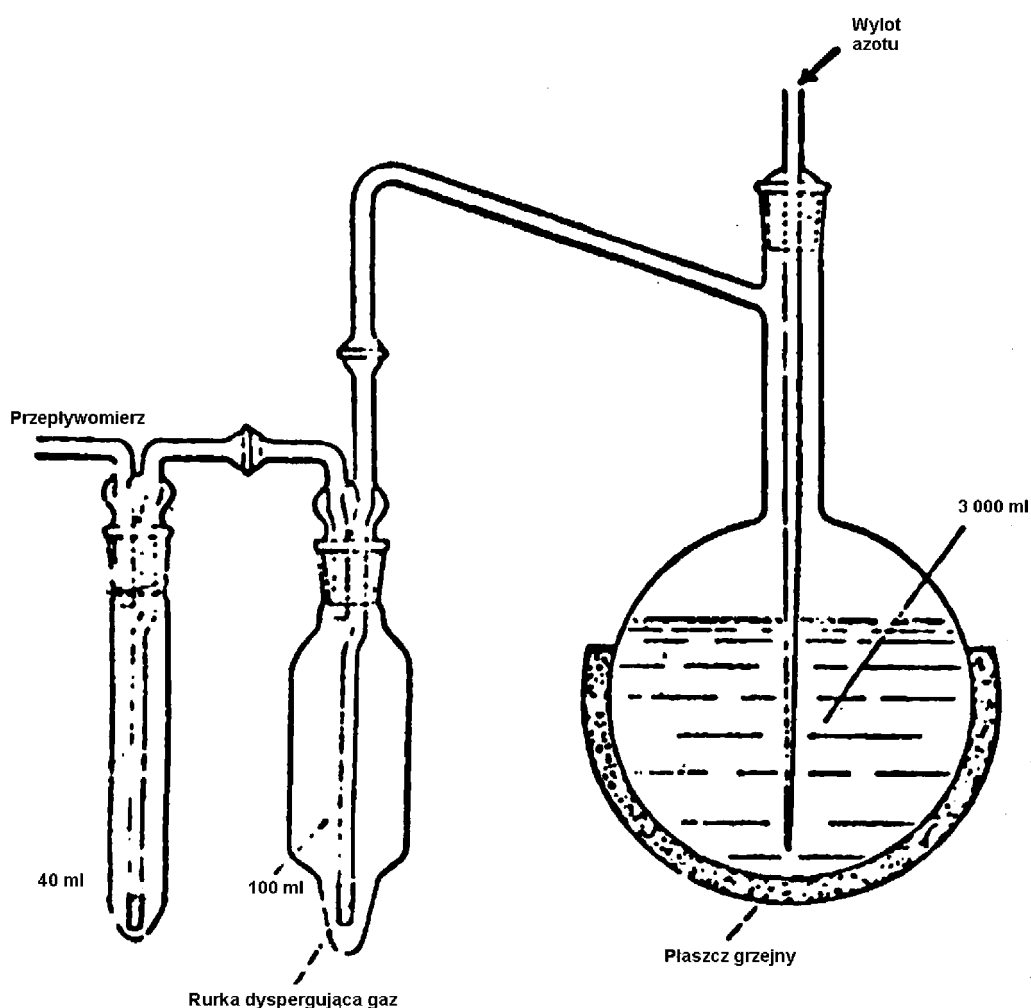
- 1) temperatura komory nastrzykowej 200 °C;
- 2) temperatura kolumny 130 °C;
- 3) przepływ gazu nośnego helu 20 ml/min.

Za pomocą mikrostrzykawki wprowadza się taką objętość roztworu wzorcowego, aby pik odpowiadający izotiocyanianowi allilowemu mógł być łatwo zidentyfikowany na uzyskanym chromatogramie.

W podobny sposób wprowadza się do chromatografu próbkę destylatu. Sprawdza się, czy czas retencji uzyskanego piku odpowiada czasowi retencji piku izotiocyanianu allilowego.

W wyżej podanych warunkach składniki występujące naturalnie w winie nie będą dawały zakłócających pików na chromatogramie badanej próbki.

Schemat aparatu do destylacji w strumieniu azotu



OZNACZANIE WSKAŹNIKA FOLIN-CIOCALTEU

Wskaźnik Folin-Ciocalteu jest to wynik oznaczania uzyskany według następującej metody: wszystkie związki fenolowe występujące w winie są utleniane przez odczynnik Folin-Ciocalteu. Odczynnik ten stanowi mieszanina kwasu fosfowolframowego ($H_3PW_{12}O_{40}$) i kwasu fosfomolibdenowego ($H_3PMo_{12}O_{40}$), które po utlenieniu fenoli ulegają redukcji do mieszaniny niebieskich tlenków wolframu (W_8O_{23}) i molibdenu (Mo_8O_{23}).

Powstała barwa niebieska wykazuje maksimum absorpcji w pobliżu 750 nm, a jej natężenie jest proporcjonalne do całkowitej ilości związków fenolowych obecnych w winie.

1. ODCZYNNIKI

- 1) odczynnik Folin-Ciocalteu sporządza się, rozpuszczając 100 g wolframianu sodu ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) i 25 g molibdenianu sodu ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) w 700 ml wody destylowanej. Następnie dodaje się 50 ml 85 % kwasu fosforowego (o gęstości $\rho_{20} = 1,71$ g/ml) i 100 ml stężonego kwasu solnego (o gęstości $\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Doprowadza się do wrzenia i gotuje przez 10 godzin pod chłodnicą zwrotną, następnie dodaje się 150 g siarczanu litu ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$), kilka kropli bromu i ponownie gotuje się przez 15 minut i odstawia do ostygnięcia, i uzupełnia wodą destylowaną do 1 litra;
- 2) bezwodny węgiel sodu (Na_2CO_3), w 20 % (m/v) roztworze;
- 3) używa się wody destylowanej lub wody o podobnej czystości.

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrofotometr umożliwiający pomiar przy długości fali 750 nm;
- 2) kolby miarowe o pojemności 100 ml.

3. WYKONANIE OZNACZANIA**Wino czerwone**

Do kolby miarowej na 100 ml odmierza się odpowiednio 1 ml wina (rozcieńczonego uprzednio w stosunku 1 : 5), 50 ml wody destylowanej, 5 ml odczynnika Folin-Ciocalteu, 20 ml roztworu węgla sodu i uzupełnia wodą do 100 ml.

Zawartość próbki miesza się dokładnie i pozostawia na 30 minut do ustabilizowania się reakcji. Absorbancję oznacza się przy 750 nm i długości drogi optycznej 1 cm w stosunku do próby ślepej, w której zamiast wina używa się wody.

Jeżeli absorbancja jest większa od wartości 0,3, próbkę się rozcieńcza.

Wina białe

Do kolby miarowej o pojemności 100 ml odmierza się odpowiednio 1 ml nierozcieńczonego wina białego, 50 ml wody destylowanej, 5 ml odczynnika Folin-Ciocalteu, 20 ml roztworu węgla sodu i uzupełnia wodą do 100 ml.

Zawartość próbki miesza się dokładnie i pozostawia na 30 minut do ustabilizowania się reakcji. Absorbancję oznacza się przy 750 nm i długości drogi optycznej 1 cm w stosunku do próby ślepej, w której zamiast wina używa się wody.

Jeżeli absorbancja jest większa od wartości 0,3, próbkę się rozcieńcza.

4. POWTARZALNOŚĆ

Różnica pomiędzy dwoma wynikami dwóch oznaczeń wykonanych równoległe lub zaraz po sobie, przez tę samą osobę, nie może być większa od jedności.

OZNACZANIE STOSUNKU IZOTOPÓW TLENU O MASIE ATOMOWEJ 18 I 16 ($^{18}O/^{16}O$)
W WODZIE ZAWARTEJ W WINIE

Metodą tą mierzy się stosunek izotopów tlenu $^{18}O/^{16}O$ w wodzie. Wyraża się go w odchyleniu (δ ‰) w stosunku do wartości stosunku izotopów międzynarodowego wzorca V.SMOW, przy zastosowaniu następującego wzoru:

$$\delta \text{ ‰} = \left[\frac{R}{R_{SMOW}} - 1 \right] \times 1000,$$

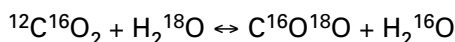
gdzie:

R — oznacza stosunek izotopów tlenu $^{18}O/^{16}O$ w badanej próbce,

R_{SMOW} — oznacza stosunek izotopów tlenu $^{18}O/^{16}O$ we wzorcu.

Stosunek izotopów tlenu $^{18}O/^{16}O$ jest określany za pomocą spektrometrii masowej stosunków izotopo-

wych (MSIR) dla strumieni jonowych $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ (m/z 46) oraz $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ (m/z 44) produkowanych przez dwutlenek węgla uzyskany po wymianie z wodą w winie zgodnie z reakcją:



W analizie jest wykorzystywany dwutlenek węgla w fazie gazowej.

1. ODCZYNNIKI

Do oznaczania proporcji izotopów tlenu $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ stosuje się następujące odczynniki:

- 1) dwutlenek węgla do analiz;
- 2) SMOW (Standard Mean Ocean Water — Standard Wody Oceanicznej);
- 3) SLAP (Standard Light Arctic Precipitation — Standard Osadu Arktycznego);
- 4) referencyjna woda wystandaryzowana w odniesieniu do próbki referencyjnej Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej w Wiedniu (IAEA).

2. APARATURA I SPRZĘT

- 1) spektrometr masowy z powtarzalnością wewnętrzną 0,05 %;
- 2) podwójny kolektor do mierzenia jonów m/z 44 i 46;
- 3) termostat ($\pm 0,5$ °C) w celu wyrównania temperatury między CO_2 i wodą zawartą w winie;
- 4) pompa próżniowa zdolna do osiągnięcia wewnętrznego ciśnienia 0,13 Pa;
- 5) fiolki na próbki o pojemności 15 ml oraz dodatkowa rurka kapilarna o wewnętrznej średnicy około 0,015 mm;
- 6) pipeta Eppendorfa z plastikową wymienną końcówką;
- 7) kolba okrągłodenna.

3. WYKONANIE OZNACZANIA

Metoda ręczna

Wprowadzenie próbki

W celu wprowadzenia próbki bierze się pipetę Eppendorfa o pojemności 1,5 ml, nakłada właściwą końcówkę i wpompowuje płyn do kolby okrągłodennej. Następnie dookoła szyjki kolby okrągłodennej nakłada się smar silikonowy i przyłącza się kolbę do zaworu, sprawdzając, czy jest dokładnie zamknięta.

Czynność powtarza się dla każdej kolby na rampie roboczej, przy czym do jednej z nich wprowadza się referencyjną wodę laboratoryjną.

Odgazowywanie rampy

Dwie rampy chłodzone płynnym azotem odpowietrza się do ciśnienia 0,1 mm Hg przez otwarcie zawo-

rów. Następnie zamyka się zawory i pozwala, aby wszystko się ponownie podgrzało. Cykl odgazowywania jest powtarzany do momentu, gdy przestaną występować wahania lub zmiany ciśnienia.

Wyrównywanie wody i CO_2

Rampy robocze schładza się do -70 °C (mieszaną płynnego azotu i alkoholu) w celu zamrożenia wody, a następnie umieszcza w próżni. Po ustabilizowaniu próżni odizolowuje się rampę przez zamknięcie zaworów oraz odgazowanie systemu wprowadzającego CO_2 . Podłącza się dopływ gazowego CO_2 do rampy roboczej i po odizolowaniu jej od reszty systemu umieszcza się rampę w łaźni z termostatem w temperaturze 25 °C ($\pm 0,5$ °C) na 12 godzin.

Transfer wymienionego CO_2 do cel pomiarowych spektrometru masowego

Stosuje się stojak na próbki, który pozwala wstawić tyle celek pomiarowych, ile jest kolb okrągłodennych zawierających wymieniony CO_2 , które są przystosowane do pustej linii za rampą roboczą. Puste celki są ostrożnie odgazowywane i wymieniony gaz zawarty w kolbach jest przenoszony do próbek uprzednio schłodzonych płynnym azotem. Następnie próbki pozostawia się do ogrzania do temperatury pokojowej.

Metoda automatyczna

W celu osiągnięcia równowagi próbki napełnia się 2 ml wina oraz 2 ml wody (referencyjna do prac laboratoryjnych) i schładza się do temperatury -18 °C. Prowadnice zawierające zamrożone produkty są przystosowywane do systemu wyrównywania i po osiągnięciu próżni w systemie jest wprowadzany dwutlenek węgla pod ciśnieniem 800 hPa. Równowaga jest osiągana przy temperaturze $22 \pm 0,5$ °C po minimalnym okresie pięciu godzin przy umiarkowanym mieszaniu. Ponieważ czas osiągnięcia równowagi zależy od kształtu fiolki, najpierw określa się optymalny czas potrzebny do uzyskania równowagi dla danego systemu.

Dwutlenek węgla zawarty w fiolkach jest następnie przenoszony do komory nastrzykowej spektrometru masowego przez rurkę kapilarną. Pomiar jest przeprowadzany zgodnie z procedurą pomiaru na danym instrumencie.

4. OBLICZANIE WYNIKÓW OZNACZANIA

Względna różnica (δ') stosunków natężenia jonów m/z 46 i 44 [I_{46}/I_{44}] pomiędzy próbka a wzorcem jest wyrażona w ‰ za pomocą następującego równania:

$$\delta'_{\text{próbki}} = \left[\frac{(I_{46}/I_{44} \text{ próbki})}{(I_{46}/I_{44} \text{ wzorca})} - 1 \right] \times 1000,$$

gdzie:

I_{46}/I_{44} próbki — oznacza stosunek natężenia jonów m/z 46 i 44 w próbce,

I_{46}/I_{44} wzorca — oznacza stosunek natężenia jonów m/z 46 i 44 we wzorcu.

Zawartość ^{18}O w próbce ($\delta'^{18}\text{O}$) w porównaniu ze wzorcem V.SMOW na skali V.SMOW/SLAP jest uzyskiwana za pomocą następującego równania:

$$\delta'^{18}\text{O} = \left[\frac{\delta' \text{ próbki} - \delta' \text{ SMOW}}{\delta' \text{ SMOW} - \delta' \text{ SLAP}} \right] \times 55,5,$$

gdzie:

- δ' próbki — oznacza względną różnicę stosunków natężenia jonów m/z 46 i 44 w próbce,
 δ' SMOW — oznacza względną różnicę stosunków natężenia jonów m/z 46 i 44 we wzorcu SMOW,
 δ' SLAP — oznacza względną różnicę stosunków natężenia jonów m/z 46 i 44 we wzorcu SLAP.

Wartość akceptowana dla SLAP jest równa 55,5 ‰ w porównaniu z V.SMOW. Proporcja izotopów we wzorcu jest określana po każdej serii 10 pomiarów nieznanymi próbek.

5. POWTARZALNOŚĆ METODY

Powtarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, z użyciem tego samego sprzętu, w krótkim odstępie czasu.

Powtarzalność metody (r) jest równa 0,24 ‰.

6. ODTWARZALNOŚĆ METODY

Odtwarzalność jest to wartość, od której jest mniejsza, z prawdopodobieństwem, wartość bezwzględna różnicy między dwoma pojedynczymi wynikami badań, uzyskanymi z zastosowaniem tej samej metody, dla tej samej próbki, w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z użyciem różnego sprzętu.

Odtwarzalność metody (R) jest równa 0,50 ‰.