ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 761/1999 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 12ης Απριλίου 1999

για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2676/90 περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων ανάλυσης που εφαρμόζονται στον οινικό τομέα

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 822/87 του Συμβουλίου, της 16ης Μαρτίου 1987, περί κοινής οργανώσεως της αμπελοοινικής αγοράς [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1627/98 [2], και ιδίως το άρθρο 74,

Εκτιμώντας:

ότι το παράρτημα του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2676/90 της Επιτροπής [3], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 822/97 [4], περιγράφει αυτές τις μεθόδους αναλύσεως στο παράρτημά του· ότι η μέθοδος αναλύσεως για το D-μηλικό οξύ που περιγράφεται στο κεφάλαιο 20 αποδείχθηκε χαμηλής ακριβείας, και ότι έχει αναπτυχθεί μια νέα ακριβέστερη μέθοδος· ότι έχει αναπτυχθεί μια νέα πιο ευαίσθητη και ευκολότερη στην εφαρμογή της μέθοδος αναλύσεως για κυανιούχα παράγωγα· ότι έχει αναπτυχθεί σε διεθνές επίπεδο μια νέα μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό του καρβαμιδικού αιθυλεστέρα στους ίνους· ότι αυτές οι τρεις νέες μέθοδοι έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένα κριτήρια· ότι η χρήση αυτών των μεθόδων μπορεί να διασφαλίσει τον καλύτερο έλεγχο της ποιότητας και γνησιότητας των οίνων και να αποφευχθούν διαμφισβητήσεις οφειλόμενες στην εφαρμογή παλαιών και με μικρή αξιοπιστία μεθόδων ανάλυσης· ότι η περιγραφή αυτών των νέων μεθόδων έχει εγκριθεί από το Διεθνές Γραφείο Αμπέλου και Οίνου· ότι πρέπει να ενσωματωθούν στον υπόψη κανονισμό·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής διαχείρισης οίνων,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2676/90 τροποποιείται ως εξής:

1. το κεφάλαιο 20 «D-μηλικό οξύ» αντικαθίσταται από το παράρτημα Ι του παρόντος κανονισμού·
2. το κεφάλαιο 38 «Κυανιούχα παράγωγα» αντικαθίσταται από το παράρτημα ΙΙ του παρόντος κανονισμού·
3. Προστίθεται το κεφάλαιο 44 που περιλαμβάνεται στο παράρτημα ΙΙΙ του παρόντος κανονισμού·

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την έβδομη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων.*

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 12 Απριλίου 1999.

Για την Επιτροπή

Franz FISCHLER

Μέλος της Επιτροπής

---

[1] ΕΕ L 84 της 27.3.1987, σ. 1.
[2] ΕΕ L 210 της 28.7.1998, σ. 10.
[3] ΕΕ L 272 της 3.10.1990, σ. 1.
[4] ΕΕ L 117 της 7.5.1997, σ. 10.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

«20. **D-ΜΗΛΙΚΟ ΟΞΥ:**

Ποσοτικός προσδιορισμός με ενζυματική μέθοδο

1. ΑΡΧΗ

Παρουσία D-μηλικής-αφυδρογενάσης (D-MDH), το D-μηλικό οξύ (D-μηλικό άλας) οξειδώνεται σε οξαλοξικό από το δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης (NAD). Το σχηματιζόμενο οξαλοξικό μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και διοξείδιο του άνθρακα.

$$\text{D-μηλικό} + NAD^+ \xrightarrow{\text{D-MDH}} \text{πυροσταφυλικό} + CO_2 + NADH + H^+$$

Η σχηματιζόμενη ποσότητα NADH, που μετριέται από την αύξηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 334, 340 ή 365 nm, είναι ανάλογη με την υπάρχουσα ποσότητα D-μηλικού.

2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια που επιτρέπουν τη διενέργεια 30 προσδιορισμών διατίθενται στο εμπόριο σε μικρό κυτίο που περιλαμβάνει:

α) φιαλίδιο 1 που περιέχει περίπου 30 ml όξινου ρυθμιστικού διαλύματος Hepes [σουλφονικό N-(2-υδροξυαιθυλο) πιπεραζινο-N'-2-αιθάνιο] pH = 9,0 και σταθεροποιητές·

β) φιαλίδιο 2 που περιέχει περίπου 210 mg λυοφιλιωμένου NAD·

γ) φιαλίδιο 3 (τρία τον αριθμό), που περιέχει τη λυοφιλιωμένη D-MDH, με τίτλο περίπου 8 μονάδες.

Παρασκευή των διαλυμάτων

1. Χρησιμοποιείται το περιεχόμενο του φιαλιδίου 1 χωρίς αραίωση. Πριν από τη χρήση, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία 20-25 °C.

2. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου 2 διαλύεται σε 4 ml δισαπεσταγμένου ύδατος.

3. Το περιεχόμενο ενός από τα φιαλίδια 3 διαλύεται σε 0,6 ml δισαπεσταγμένου ύδατος. Πριν από τη χρήση, το διάλυμα φέρεται στους 20-25 °C.

Σταθερότητα των διαλυμάτων

Το περιεχόμενο του φιαλιδίου 1 διατηρείται τουλάχιστον ένα χρόνο στους +4 °C. Το διάλυμα 2 διατηρείται περίπου 3 εβδομάδες στους +4 °C και 2 μήνες στους −20 °C. Το διάλυμα 3 διατηρείται 5 ημέρες στους +4 °C.

3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

3.1. Φασματοφωτόμετρο για την εκτέλεση της μέγιστης απορρόφησης του NADH στα 340 nm. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φωτόμετρο ασυνεχούς φάσματος που επιτρέπει την εκτέλεση των μετρήσεων στα 334 nm και 365 nm. Επειδή πρόκειται για απόλυτες μετρήσεις απορρόφησης (δεν χρησιμοποιείται σειρά προτύπων διαλυμάτων, αλλά γίνεται αναφορά στο συντελεστή εξασθενίσεως του NADH), οι κλίμακες των μηκών κύματος και των απορροφήσεων της συσκευής πρέπει να είναι ελεγχόμενες.

3.2. Γυάλινες κυψελίδες με μήκος οπτικής διαδρομής 1 cm ή κυψελίδες μιας χρήσης.

3.3. Μικροσιφώνια που επιτρέπουν τη λήψη ποσοτήτων όγκου μεταξύ 0,01 και 2 ml.

4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο προσδιορισμός του D-μηλικού πραγματοποιείται εν γένει στον οίνο απευθείας χωρίς προηγούμενο αποχρωματισμό.

Επειδή η ποσότητα του D-μηλικού στην κυψελίδα πρέπει να είναι μεταξύ 2 μg και 50 μg, ο οίνος πρέπει να αραιώνεται έτσι ώστε η συγκέντρωση του μηλικού να είναι μεταξύ 0,02 και 0,5 g/l ή 0,02 και 0,3 g/l (ανάλογα με τον εξοπλισμό).

Πίνακας αραιώσεως:

Εκτιμώμενη ποσότητα D-μηλικού/λίτρο		Αραίωση με νερό	Συντελεστής αραίωσης F
Μέτρηση στα:			
340 ή 334 nm	365 nm		
< 0,3 g	< 0,5 g	—	1
0,3 – 3,0 g	0,5 – 5,0 g	1 + 9	10

5. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με το φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 340 nm, πραγματοποιούνται μετρήσεις απορροφήσεως σε κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1 cm, λαμβάνοντας ως μηδέν την απορρόφηση στον αέρα (χωρίς δηλ. την ύπαρξη κυψελίδας) ή στο νερό.

Στις κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1 cm προστίθενται:

	Μάρτυρας	Δοκιμή
Διάλυμα 1	1,00 ml	1,00 ml
Διάλυμα 2	0,10 ml	0,10 ml
Δισαπεσταγμένο νερό	1,80 ml	1,70 ml
Δείγμα	—	0,10 ml

Ακολουθεί ανάμειξη. Μετά 6 περίπου λεπτά, μετρώνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων, μάρτυρα και δοκιμής (A_1).

Προστίθεται:

	Μάρτυρας	Δοκιμή
Διάλυμα 3	0,05 ml	0,05 ml

Ακολουθεί ανάμειξη και αναμένεται το πέρας της αντίδρασης (περίπου 20 min.) και μετρώνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων, μάρτυρα και δοκιμής (A_2).

Προσδιορίζονται οι διαφορές των απορροφήσεων ($A_2 - A_1$) του μάρτυρα (ΔA_T) και της δοκιμής (ΔA_E). Η διαφορά απορρόφησης του μάρτυρα αφαιρείται από τη διαφορά απορρόφησης του δείγματος δοκιμής: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Παρατήρηση: Ο αναγκαίος χρόνος για τη δράση των ενζύμων μπορεί να διαφέρει από τη μια παρτίδα στην άλλη. Ο αναφερόμενος παραπάνω χρόνος έχει ενδεικτική μόνο σημασία. Συνιστάται να προσδιορίζεται για κάθε παρτίδα.

Το D-μηλικό οξύ αντιδρά γρήγορα. Λόγω της πρόσθετης δράσης του ενζύμου, μετασχηματίζεται και το L-τρυγικό οξύ έστω κι αν η ταχύτητα είναι πολύ μικρότερη. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο υπάρχει μια ασθενής παράπλευρη αντίδραση που μπορεί να διορθωθεί με παρέκταση (βλ. παράρτημα A).

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η συγκέντρωση σε χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο δίδεται από τον γενικό τύπο:

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

όπου:

V = όγκος του δείγματος δοκιμής σε ml (εδώ 2,95 ml)
v = όγκος του δείγματος οίνου σε ml (εδώ 0,1 ml)
PM = μοριακό βάρος της προς προσδιορισμό ουσίας (εδώ D-μηλικό οξύ = 134.09)
d = οπτική διαδρομή της κυψελίδας σε cm (εδώ 1 cm)
ε = συντελεστής απορρόφησης του NADH:
στα 340 nm = 6,3 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
στα 365 nm = 3,4 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
στα 334 nm = 6,18 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Εφόσον κατά την παρασκευή του δείγματος οίνου έχει γίνει αραίωση, το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί το συντελεστή αραιώσεως.

Η συγκέντρωση σε D-μηλικό οξύ δίδεται σε χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο (mg/l) χωρίς δεκαδικά.

7. ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ

Στο παράρτημα Β περιλαμβάνονται τα στοιχεία των διεργαστηριακών δοκιμών που αφορούν την πιστότητα της μεθόδου. Οι τιμές των διεργαστηριακών δοκιμών μπορεί να μην εφαρμόζονται σε συγκεντρώσεις προσδιοριζόμενης ένωσης και δείγματα δοκιμής διαφορετικά από εκείνα του παραρτήματος Β.

7.1. **Επαναληψιμότητα**

Η απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο μεμονωμένων αποτελεσμάτων που λαμβάνονται σε ταυτόσημο υλικό που υποβάλλεται σε δοκιμή, από ερευνητή που χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό, στο συντομότερο χρονικό διάστημα, δεν πρέπει να υπερβαίνει την τιμή επαναληψιμότητας r σε περισσότερες του 5 % περιπτώσεις.

Η τιμή είναι: r = 11 mg/l.

7.2. **Αναπαραγωγιμότητα**

Η απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο μεμονωμένων αποτελεσμάτων που λαμβάνονται σε ταυτόσημο υλικό που υποβάλλεται σε δοκιμή σε δύο εργαστήρια δεν πρέπει να να υπερβαίνει την τιμή αναπαραγωγιμότητας R σε περισσότερες του 5 % περιπτώσεις.

Η τιμή είναι: R = 20 mg/l.

8. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Λαμβανομένης υπόψη της ακρίβειας της μεθόδου, τιμές για D-μηλικό οξύ κατώτερες των 50 mg/l πρέπει να επιβεβαιώνονται εν ανάγκη και με άλλη μέθοδο αναλύσεως χρησιμοποιώντας άλλη αρχή μετρήσεως, π.χ. εκείνη των Przyborski et al, (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993· 215-218. 1993).

Η δειγματισθείσα ποσότητα οίνου στην κυψελίδα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,1 ml για να αποφευχθεί ενδεχόμενη παρεμπόδιση της ενζυματικής δράσης από τις πολυφαινόλες.

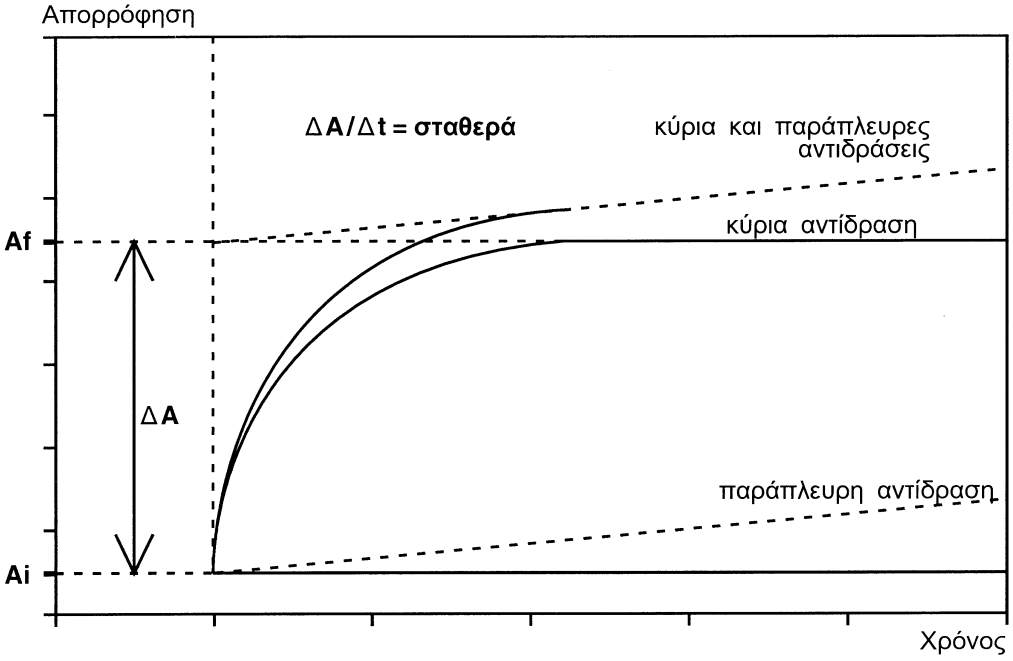
Προσάρτημα Α

Αντιμετώπιση των παράπλευρων αντιδράσεων

Οι παράπλευρες αντιδράσεις οφείλονται γενικά σε δευτερεύουσες αντιδράσεις του ενζύμου, στην παρουσία άλλων ενζύμων στο δείγμα ή στην αλληλεπίδραση ενός ή περισσότερων στοιχείων του δείγματος με κάποιο συμπαράγοντα της ενζυματικής αντίδρασης.

Στην κανονική αντίδραση, η απορρόφηση φθάνει σε μια σταθερή τιμή έπειτα από ορισμένο χρονικό διάστημα, της τάξης εν γένει των 10 min έως 20 min, ανάλογα με την ταχύτητα της ειδικής ενζυματικής αντίδρασης. Εντούτοις, εφόσον υπάρχουν δευτερεύουσες αντιδράσεις, η απορρόφηση δεν φθάνει σε κάποια σταθερή τιμή αλλά παρουσιάζει ρυθμική αύξηση με την πάροδο του χρόνου. Ο τύπος αυτός διεργασίας ονομάζεται συνήθως "παράπλευρη αντίδραση".

Εφόσον παρουσιάζεται αυτό το πρόβλημα, πρέπει να μετριέται η απορρόφηση του διαλύματος σε τακτικά διαστήματα (2 min έως 5 min), μετά το χρόνο που απαιτείται για να φθάσει το πρότυπο διάλυμα στην τελική του τιμή απορρόφησης. Όταν η απορρόφηση παρουσιάζει ρυθμική αύξηση, πραγματοποιούνται 5 ή 6 μετρήσεις και κατόπιν προβαίνουμε σε γραφική παρέκταση ή σε υπολογισμό, για να ληφθεί η απορρόφηση που πρέπει να είναι εκείνη του διαλύματος τη στιγμή κατά την οποία προστίθεται το τελικό ένζυμο (TO). Η διαφορά της βάσει παρεκτάσεως απορρόφησης εκείνη τη στιγμή (Af – Ai) χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



Εικονα 1: παράπλευρη αντίδραση

Προσάρτημα Β

Στατιστικά των διεργαστηριακών δοκιμών

Έτος διενέργειας των δοκιμών: 1995
Αριθμός εργαστηρίων: 8
Αριθμός δειγμάτων: 5 με προσθήκη D-μηλικού οξέος

Δείγμα	Α	Β	Γ	Δ	Ε
Αριθμός εργαστηρίων που έμειναν μετά τη διαγραφή των εργαστηρίων που παρουσίαζαν παρεκκλίνοντα αποτελέσματα	7	8	7	8	7
Αριθμός εργαστηρίων με παρεκκλίνοντα αποτελέσματα	1	—	1	—	1
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	35	41	35	41	36
Μέση τιμή ($\bar{\chi}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Σχετική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Όριο επαναληψιμότητας (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Τύποι δειγμάτων:
Α: ερυθρός οίνος· Β: ερυθρός οίνος· Γ: λευκός οίνος· Δ: λευκός οίνος· Ε: λευκός οίνος·»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

«38. **ΚΥΑΝΙΟΥΧΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ**

(*Προσοχή:* Να ακολουθούνται οι οδηγίες ασφαλείας κατά τη μεταχείριση των χημικών προϊόντων, για την χλωραμίνη Τ, την πυριδίνη, το κυανούχο κάλιο, το υδροχλωρικό οξύ και το φωσφορικό οξύ. Να απομακρύνονται τα χρησιμοποιηθέντα προϊόντα κατά τρόπο κατάλληλο και συμβατό προς τους ισχύοντες οικολογικούς κανόνες και κανονισμούς. Να λαμβάνεται ιδιαίτερη προφύλαξη με το κυανυδρικό οξύ που απελευθερώνεται κατά την απόσταξη του οξινισμένου οίνου.)

1. ΑΡΧΗ

Το ελεύθερο και ολικό κυανυδρικό οξύ του οίνου απελευθερώνεται με όξινη υδρόλυση και διαχωρίζεται με απόσταξη. Έπεται από αντίδραση με χλωραμίνη Τ και πυριδίνη, η σχηματιζόμενη γλουτακονική διαλδεΰδη προσδιορίζεται ποσοτικά με χρωματομετρία μέσω του κυανού χρωματισμού που δίνει με διμεθυλο-1,3-βαρβιτουρικό οξύ.

2. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1. **Συσκευή αποστάξεως**

Χρησιμοποιείται η συσκευή αποστάξεως που περιγράφεται για τον προσδιορισμό του κατ' όγκον αλκοολικού τίτλου.

2.2. Εσμυρισμένη τυποποιημένη σφαιρική φιάλη των 500 ml.

2.3. Υδρόλουτρο 20 °C με θερμοστάτη.

2.4. Φασματοφωτόμετρο για τη διενέργεια μετρήσεων απορρόφησης σε μήκος κύματος 590 nm.

2.5. Γυάλινες κυψελίδες ή κυψελίδες μιας χρήσης με οπτική διαδρομή 20 mm.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1. Φωσφωρικό οξύ (H_3PO_4) 25 % (m/v).

3.2. Διάλυμα χλωραμίνης Τ ($C_7H_7ClNNaO_2S, 3H_2O$) 3 % (m/v).

3.3. Διάλυμα 1,3-διμεθυλοβαρβιτουρικού οξέος: 3,658 g 1,3 διμεθυλο βαρβιτουρικού οξέος ($C_6H_8N_2O_3$) διαλύονται σε 15 ml πυριδίνης και 3 ml υδροχλωρικού οξέος ($\rho_{20} = 1{,}19$ g/ml) και το προκύπτον διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τα 50 ml με απεσταγμένο νερό.

3.4. Κυανιούχο κάλιο (KCN).

3.5. Διάλυμα ιωδιούχου καλίου (KI) 10 % (m/v).

3.6. Διάλυμα νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$), 0,1 M.

4. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

4.1. **Απόσταξη**

Στη φιάλη των 500 ml (2.2) φέρονται 25 ml οίνου, 50 ml απεσταγμένου νερού, 1 ml φωσφορικού οξέος (3.1) και μερικά γυάλινα σφαιρίδια. Η φιάλη τοποθετείται αμέσως στη συσκευή αποστάξεως. Το απόσταγμα διαβιβάζεται με μακρόστενο σωλήνα σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml που περιέχει 10 ml νερό. Παραλαμβάνονται 30-35 ml αποστάγματος (δηλ. περίπου 45 ml συνολικά υγρό στην ογκομετρική φιάλη).

Ο μακρόστενος σωλήνας του ψύκτη πλένεται με μερικά χιλιοστόλιτρα απεσταγμένο νερό, το απόσταγμα φέρεται στους 20 °C και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή της φιάλης με απεσταγμένο νερό.

4.2. **Μέτρηση**

Σε κωνική φιάλη των 50 ml με εσμυρισμένο πώμα φέρονται 25 ml αποστάγματος, προστίθεται 1 ml διαλύματος χλωραμίνης Τ (3.2) και η φιάλη πωματίζεται ερμητικά. Μετά 60 δευτερόλεπτα ακριβώς, προστίθενται 3 ml διαλύματος δυμεθυλο -1,3- βαρβιτουρικού οξέος (3.3), η φιάλη πωματίζεται ερμητικά και αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά. Στη συνέχεια μετριέται η απορρόφηση σε σχέση με το μάρτυρα (25 ml απεσταγμένο νερό αντί 25 ml αποστάγματος) σε μήκος κύματος 590 nm στις κυψελίδες οπτικής διαδρομής 20 mm.

5. ΧΑΡΑΞΗ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

5.1. **Τιτλοδότηση του κυανιούχου καλίου με νιτρικό άργυρο**

Σε ογκομετρική φιάλη των 300 ml διαλύονται επακριβώς ζυγισμένα περίπου 0,2 g KCN (3.4) σε 100 ml απεσταγμένο νερό. Προστίθενται 0,2 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (3.5) και το διάλυμα τιτλοδοτείται με διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1 M (3.6) μέχρι να επιτευχθεί σταθερή κιτρινωπή χρώση.

Ο τίτλος του δείγματος KCN υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη ότι 1 ml διαλύματος 0,1 M νιτρικού αργύρου αντιστοιχεί σε 13,2 mg KCN.

5.2. **Καμπύλη αναφοράς**

5.2.1. *Παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων:*

Γνωρίζοντας τον τίτλο του KCN που προσδιορίστηκε σύμφωνα με το 5.1., παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα που περιέχει 30 mg/l κυανυδρικού οξέος (30 mg HCN ≅ 72,3 mg KCN). Το διάλυμα αυτό αραιώνεται στο 1/10.

Σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml προστίθενται 1,0- 2,0- 3,0- 4,0- και 5,0 ml από το αραιωμένο πρότυπο διάλυμα και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό. Τα παρασκευαζόμενα διαλύματα έχουν αντίστοιχους τίτλους 30-60-90-120 και 150 μg/l σε κυανυδρικό οξύ.

5.2.2. *Προσδιορισμός*

Λαμβάνονται 25 ml από τα ληφθέντα ανωτέρω διαλύματα και συνεχίζουμε όπως περιγράφεται παραπάνω στο 4.1 και 4.2.

Με βάση τις λαμβανόμενες τιμές απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές περιεκτικότητας σε κυανυδρικό οξύ, χαράσσεται ευθεία που διέρχεται από την αρχή των αξόνων.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το κυανυδρικό οξύ εκφράζεται σε μικρογραμμάρια ανά λίτρο (μg/l) χωρίς δεκαδικά.

6.1. **Υπολογισμός**

Η περιεκτικότητα σε κυανυδρικό οξύ βρίσκεται βάσει της καμπύλης αναφοράς. Εάν έχει γίνει αραίωση, το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί το συντελεστή αραιώσεως.

Επαναληψιμότητα (r) και αναπαραγωγιμότητα (R)

Λευκός οίνος = $r = 3{,}1\ \mu g/l$ ήτοι περίπου 6 %. x_i

$R = 12\ \mu g/l$ ήτοι περίπου 25 %. x_i

Ερυθρός οίνος = $r = 6{,}4\ \mu g/l$ ήτοι περίπου 8 %. x_i

$R = 23\ \mu g/l$ ήτοι περίπου 29 %. x_i

x_i = μέση συγκέντρωση HCN στον οίνο

$x_i = 48{,}4\ \mu g/l$ για το λευκό οίνο

$x_i = 80{,}5\ \mu g/l$ για τον ερυθρό οίνο.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

44. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ: ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

(Εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό καρβαμιδικού αιθυλεστέρα σε συγκεντρώσεις μεταξύ 10 και 200 μg/l)

(*Προσοχή:* Τηρείτε τις οδηγίες ασφαλείας σχετικά με το χειρισμό των χημικών προϊόντων όσον αφορά την αιθανόλη, την ακετόνη και τα καρκινιγόνα προϊόντα: καρβαμιδικό αιθυλεστέρα και διχλωρομεθάνιο. Οι χρησιμοποιημένοι διαλύτες να απορρίπτονται με κατάλληλο τρόπο σύμφωνα με τους κανόνες και τους ισχύοντες οικολογικούς κανονισμούς).

Α. Αρχή της μεθόδου

Σε δείγμα προστίθεται καρβαμιδικός προπυλεστέρας ως εσωτερικό πρότυπο, το διάλυμα αραιώνεται με νερό και φέρεται σε στήλη εκχυλίσεως στερεάς φάσεως 50 ml. Ο καρβαμιδικός αιθυλεστέρας και προπυλεστέρας εκλούονται με διχλωρομεθάνιο.

Το έκλουσμα συμπυκνώνεται με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό. Το συμπύκνωμα αναλύεται με αέρια χρωματογραφία (CG) και γίνεται ανίχνευση με φασματοφωτομετρία μάζας με τη μέθοδο SIM (Selected ions monitoring).

Β. Εξοπλισμός και χρωματογραφικές συνθήκες (δίδονται ως παράδειγμα)

α) Αέριο χρωματογράφημα/φασματομετρία μάζας (CG/SM) και ενδεχομένως σύστημα διέλευσης δειγμάτων και σύστημα επεξεργασίας δεδομένων ή ισοδύναμο σύστημα.

Τριχοειδής στήλη διοξειδίου του πυριτίου 30 m (*) x 0,25 mm ∅ εσωτ., φίλμ τύπου Carbowax 20M πάχους 0.25 μm.

Τρόπος εργασίας: διάταξη έγχυσης 180 °C, ήλιο ως φέρον αέριο με ταχύτητα ροής 1 ml/min. και στους 25 °C, έγχυση σύμφωνα με τη μέθοδο «Splitless/split».

Πρόγραμμα θερμοκρασίας: 40 °C, επί 0,75 min., στη συνέχεια ρυθμός αυξήσεως 10 °C/min. μέχρι τους 60 °C, και κατόπιν 3 °C/min. μέχρι τους 150 °C (**), μετάβαση στους 220 °C, και διατήρηση στους 220 °C, επί 4,25 min. Ο ειδικός χρόνος κατακράτησης του καρβαμιδικού αιθυλεστέρα είναι 23-27 min. ενώ του καρβαμιδικού προπυλεστέρα είναι 27-31 min.

Διεπαφή αερίου χρωματογράφου/φασματοφωτομέτρου (CG/SM): γραμμή μεταφοράς 220 °C. Οι παράμετροι φασματοφωτομέτρου μάζας ρυθμίζονται με το χέρι με υπερθοροτριβουτιλαμίνη και βελτιστοποιούνται για χαμηλότερη ευαισθησία μάζας, τρόπος καταγραφής σήματος SIM, υστέρηση διαλύτη και χρόνος έναρξης καταγραφής 22 min., χρόνος διατήρησης/ιόν 100 ms.

β) Περιστροφικός εξατμιστήρας υπό κενό ή σύστημα συμπύκνωσης τύπου Kuderna Danish.

(*Σημείωση:* ο βαθμός ανάκτησης του καρβαμιδικού αιθυλεστέρα του δείγματος δοκιμής, Γ(ζ) πρέπει να είναι μεταξύ 90-110 % κατά τη διάρκεια της διαδικασίας).

γ) Φιάλη — μονόλεμη απιοειδής, 300 ml, με εσμυρισμένο λαιμό.

δ) Σωλήνας συμπύκνωσης — 4 ml, βαθμολογημένος, με πώμα και παρέμβυσμα από τεφλόν.

Γ. Αντιδραστήρια

α) Ακετόνη — ποιότητα LC.

Σημείωση: Κάθε παρτίδα πρέπει να ελέγχεται πριν χρησιμοποιηθεί με CG/SM για να επιβεβαιώνεται ότι δεν υπάρχει απόκριση για τα ιόντα με m/z 62, 74 και 89.

β) Διχλωρομεθάνιο

Σημείωση: Κάθε παρτίδα πρέπει να αναλύεται πριν χρησιμοποιηθεί με CG/SM έπειτα από συμπύκνωση στο 200πλάσιο, για να επιβεβαιώνεται ότι δεν υπάρχει απόκριση για ιόντα με m/z 62, 74 και 89.

γ) Αιθανόλη — άνυδρη

(*) Για ορισμένους ιδιαίτερα πλούσιους οίνους, μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι καλύτερο να χρησιμοποιηθεί τριχοειδής στήλη μήκους 50 m.

(**) Για ορισμένους ιδιαίτερα πλούσιους οίνους, μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι καλύτερος ο προγραμματισμός της θερμοκρασίας σε 2 °C ανά λεπτό.

δ) Καρβαμιδικός αιθυλεστέρας (ΚΑ), πρότυπα διαλύματα

1. Μητρικό διάλυμα — 1,00 mg/ml. Ζυγίζονται 100 mg ΚΑ (καθαρότητας ≥ 99 %) σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και αραιώνονται με ακετόνη.

2. Πρότυπο διάλυμα εργασίας — 10,0 μg/ml. 1 ml του μητρικού διαλύματος ΚΑ μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνεται με ακετόνη μέχρι τη χαραγή.

ε) Καρβαμιδικός προπυλεστέρας (ΚΠ), πρότυπα διαλύματα

1. Μητρικό διάλυμα — 1,00 mg/ml. Ζυγίζονται 100 mg ΚΠ (καθαρότητας αντιδραστηρίου) σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνονται με ακετόνη μέχρι τη χαραγή.

2. Πρότυπο διάλυμα εργασίας 10,0 μg/ml. 1 ml του μητρικού διαλύματος ΚΠ μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνεται με ακετόνη μέχρι τη χαραγή.

3. Πρότυπο εσωτερικό διάλυμα ΚΠ — 400 ng/ml. 4 ml προτύπου διαλύματος εργασίας ΚΠ μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνονται με νερό μέχρι τη χαραγή.

στ) Βαθμονομημένα πρότυπα διαλύματα ΚΑ — ΚΠ

Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας ΚΑ, (δ) (2), και ΚΠ (ε) (2), αραιώνονται με διχλωρομεθάνιο ώστε να ληφθούν:

1. (100 ng ΚΑ και 400 ng ΚΠ)/ml·

2. (200 ng ΚΑ και 400 ng ΚΠ)/ml·

3. (400 ng ΚΑ και 400 ng ΚΠ)/ml·

4. (800 ng ΚΑ και 400 ng ΚΠ)/ml·

5. (1.600 ng ΚΑ και 400 ng ΚΠ)/ml.

ζ) Δείγμα δοκιμής — 100 ng ΚΑ/ml σε 40 % αιθανόλη.

1 ml των προτύπων διαλυμάτων εργασίας ΚΑ, (δ) (2) μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και αραιώνεται με 40 % αιθανόλη μέχρι τη χαραγή.

η) Στήλη εκχύλισης στερεά φάσεως — Μιας χρήσεως, προσυσκευασμένη με γη διατόμων, χωρητικότητας 50 ml.

Σημείωση: Πριν από την ανάλυση, κάθε παρτίδα στηλών εκχυλίσεως ελέγχεται ως προς την ανάκτηση του ΚΑ και ΚΠ και την απουσία απόκρισης για ιόντα με m/z 62, 74 και 89. Ετοιμάζονται 100 ng ΚΑ/ml δείγματος δοκιμής (ζ). Αναλύοντας 5,00 ml του δείγματος δοκιμής όπως περιγράφεται στα σημεία Δ(α), Ε και ΣΤ. Η ανάκτηση 90-110 ng ΚΑ/ml είναι ικανοποιητική. Απορροφητικά υλικά με ακανόνιστη διάμετρο σωματιδίων μπορεί να οδηγήσουν σε πολύ βραδείες παροχές που επηρεάζουν την ανάκτηση των ΚΑ και ΚΠ. Εάν, έπειτα από πολλές δοκιμές, δεν επιτευχθεί το 90-110 % της τιμής του δείγματος δοκιμής, η στήλη αντικαθίσταται ή χρησιμοποιείται διορθωμένη καμπύλη βαθμονόμησης της ανάκτησης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ΚΑ. Για τη χάραξη της διορθωμένης καμπύλης βαθμονόμησης, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα όπως περιγράφεται στο (στ) χρησιμοποιώντας 40 % αιθανόλη αντί διχλωρομεθανίου.

1 ml του προτύπου διαλύματος βαθμονόμησης αναλύεται όπως περιγράφεται στα Δ, Ε και ΣΤ.

Χαράσσεται νέα καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας τη σχέση ΚΑ/ΚΠ των εκχυλισμένων προτύπων.

Δ. **Παρασκευή του δείγματος δοκιμής**

Το προς δοκιμή υλικό φέρεται σε δύο χωριστά ποτήρια των 100 ml χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες ποσότητες:

α) Οίνοι με περιεκτικότητα σε αλκοόλη μεγαλύτερη του 14 % vol.: 5,00 ml ± 0,01 ml·

β) Οίνοι με περιεκτικότητα σε αλκοόλη μέχρι 14 % vol.: 20,00 ml ± 0,01 ml.

Σε κάθε ποτήρι, προστίθεται 1 ml εσωτερικού προτύπου διαλύματος ΚΠ, Γ(ε) (3) και νερό μέχρι συνολικού όγκου 40 ml (ή 40 g).

Ε. **Εκχύλιση**

Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε απαγωγό με επαρκή εξαερισμό.

Το παρασκεύασμα του Δ μεταφέρεται στη στήλη εκχυλίσεως.

Το ποτήρι εκπλύνεται με 10 ml νερό και το νερό εκπλύσεως μεταφέρεται στη στήλη.

Το υγρό αφήνεται να απορροφηθεί στη στήλη για 4 λεπτά. — Ακολουθεί έκλουση με 2 × 80 ml διχλωρομεθανίου. Το έκλουσμα παραλαμβάνεται σε κωνική φιάλη των 300 ml.

Το έκλουσμα εξατμίζεται μέχρις όγκου 2 έως 3 ml με τον περιστροφικό εξατμιστήρα σε υδρόλουτρο στους 30 °C. (*Σημείωση:* = δεν επιτρέπεται εξάτμιση μέχρι ξηρού).

Το συμπυκνωμένο υπόλειμμα μεταφέρεται σε βαθμολογημένο δοκιμαστικό σωλήνα 4 ml, με τη βοήθεια σιφωνίου Pasteur.

Η φιάλη εκπλύνεται με 1 ml διχλωρομεθάνιο και το υγρό εκπλύσεως μεταφέρεται στο δοκιμαστικό σωλήνα. Το δείγμα συμπυκνώνεται μέχρις 1 ml υπό ασθενές ρεύμα αζώτου.

Το συμπύκνωμα μεταφέρεται ενδεχομένως σε φιάλη της διάταξης διέλευσης του δείγματος για ανάλυση CG/SM.

ΣΤ. **Ανάλυση CG/SM**

α) Καμπύλη βαθμονόμησης

1 μl από κάθε πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης Γ (στ), εγχύεται στη διάταξη CG/SM. Παρίστανται γραφικά η σχέση των εμβαδών ΚΑ-ΚΠ για την απόκριση του ιόντος με m/z 62 (άξονας τεταγμένων) συναρτήσει της ποσότητας του ΚΑ σε ng/ml (δηλ. 100, 200 400, 800, 1600 ng/ml) σε άξονα τετμημένων.

β) Ποσοτικός προσδιορισμός ΚΑ

1 μl συμπηκνωμένου εκχυλίσματος Ε εγχύεται στο σύστημα CG/SM και υπολογίζεται η σχέση των εμβαδών ΚΑ-ΚΠ για το ιόν με m/z 62. Η συγκέντρωση του ΚΑ (ng/ml) στο εκχύλισμα προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας την καμπύλη αναφοράς με χρήση εσωτερικού προτύπου. Η συγκέντρωση ΚΑ στο δείγμα δοκιμής (ng/ml) υπολογίζεται διαιρώντας την ποσότητα του ΚΑ (ng) στο εκχύλισμα δια του όγκου του δείγματος δοκιμής (ml).

γ) Επαλήθευση της καθαρότητας του ΚΑ

Προσδιορίζεται αν κατά το χρόνο κατακράτησης του ΚΑ εμφανίζονται οι αποκρίσεις για τα ιόντα με m/z 62, 74 και 89. Οι αποκρίσεις αυτές είναι χαρακτηριστικές αντίστοιχα των βασικών θραυσμάτων $(M - C_2H_2)^+$ και $(M - CH_3)^+$ και του μοριακού ιόντος (M). Η παρουσία ΚΑ επιβεβαιώνεται εφόσον οι σχετικές αναλογίες των ιόντων αυτών δεν αποκλίνουν κατά περισσότερο από 20 % από τις αναλογίες για το πρότυπο ΚΑ. Το εκχύλισμα μπορεί να χρειάζεται να επανασυμπυκνωθεί για να ληφθεί ικανή απόκριση για το ιόν με m/z 89.

Ζ. **Διεργαστηριακή ανάλυση**

Στον πίνακα εμφαίνονται τα επιμέρους αποτελέσματα για το δείγμα πρακτικής εξάσκησης και για τους δύο τύπους οίνων.

Η εφαρμογή της δοκιμής Cochran είχε ως αποτέλεσμα τη διαγραφή ενός μόνο ζεύγους αποτελεσμάτων, τόσο για τους οίνους με αλκοολικό τίτλο ανώτερο του 14 % vol. όσο και για εκείνους με αλκοολικό τίτλο κατώτερο ή ίσο του 14 % vol., από διαφορετικό εργαστήριο το καθένα.

Η σχετική αναπαραγωγιμότητα τείνει να μειωθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης σε καρβαμιδικό αιθυλεστέρα.

Απόδοση της μεθόδου για τον προσδιορισμό καρβαμιδικού αιθυλεστέρα ΚΑ σε αλκοολούχα ποτά με CG/EM

Δείγμα	Μέση ανευρισκόμενη τιμή ΚΑ ng/ml	Ανάκτηση προστιθέμενου ΚΑ %	S_r	S_R	RSD_r %	RSD_R %
Οίνος με τίτλο άνω του 14 % vol	40		1,59	4,77	4,01	12,02
	80	89	3,32	7,00	4,14	8,74
	162	90	8,20	11,11	5,05	6,84
Οίνος με τίτλο κάτω του 14 % vol	11		0,43	2,03	3,94	18,47
	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86