KOMISSION ASETUS (EY) N:o 761/1999,

annettu 12 päivänä huhtikuuta 1999,

yhteisön viinianalyysimenetelmistä annetun asetuksen (ETY) N:o 2676/90 muuttamisesta

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon viinikaupan yhteisestä järjestämisestä 16 päivänä maaliskuuta 1987 annetun neuvoston asetuksen (ETY) N:o 822/87 ([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 1627/98 ([2]), ja erityisesti sen 74 artiklan,

sekä katsoo, että

komission asetuksen (ETY) N:o 2676/90 ([3]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 822/97 ([4]), liitteessä esitetään kyseiset määritysmenetelmät, 20 luvussa esitetty D-omenahapon määritysmenetelmä on osoittautunut epätarkaksi, ja on kehitetty uusi ja tarkempi menetelmä; syaanivetyhapon johdannaisille on kehitetty herkempi ja helpompi määritysmenetelmä; etyylikarbamaatin määrittämiseksi viineissä on kehitetty uusi kansainvälinen menetelmä, ja kyseiset kolme menetelmää on validoitu kansainvälisesti tunnustettujen periaatteiden mukaan; käyttämällä kyseisiä menetelmiä voidaan varmistaa parempi viinien laadun ja autenttisuuden valvonta ja välttää vanhojen ja epätarkkojen määritysmenetelmien käytöstä johtuvat riita-asiat; Kansainvälinen viinivirasto on vahvistanut nämä uudet menetelmät; ne on lisättävä kyseiseen asetukseen, ja

tässä asetuksessa säädettävät toimenpiteet ovat viinin hallintokomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT SEURAAVAN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetuksen (ETY) N:o 2676/90 liite seuraavasti:

1. Korvataan luku 20 ”D-Omenahappo” tämän asetuksen liitteellä I.
2. Korvataan luku 38 ”Syaanivetyhapon johdannaiset” tämän asetuksen liitteellä II.
3. Lisätään tämän asetuksen liitteessä III oleva luku 44.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan seitsemäntenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä.*

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 12 päivänä huhtikuuta 1999.

Komission puolesta

Franz FISCHLER

Komission jäsen

([1]) EYVL L 84, 27.3.1987, s. 1.
([2]) EYVL L 210, 28.7.1998, s. 10.
([3]) EYVL L 272, 3.10.1990, s. 1.
([4]) EYVL L 117, 7.5.1997, s. 10.

LIITE I

"20. D-OMENAHAPPO

(Entsymaattinen määritysmenetelmä)

1. PERIAATE

D-omenahappodehydrogenaasin (D-MDH) ja nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin (NAD) läsnäollessa D-omenahappo hapettuu oksaloasetaatiksi. Oksaloasetaatti muuttuu pyruvaatiksi ja hiilidioksidiksi.

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

Muodostuneen NADH:n määrä, joka mitataan absorbanssin lisääntymisenä aallonpituudella 334, 340 tai 365 nm, on suhteessa D-omenahapon määrään.

2. REAGENSSIT

Reagenssit, joilla voidaan tehdä noin 30 määritystä, ovat saatavina kaupallisesti testipakkauksina, joissa on:

a) pullo 1, jossa on noin 30 ml Hepes-puskuriliuosta [N-(2-hydroksietyyli)piperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo], pH = 9,0, ja stabilisaattoreita;

b) pullo 2, jossa on noin 210 mg kylmäkuivattua NAD:tä;

c) pullo 3 (kolme kappaletta), joissa on kylmäkuivattua D-MDH:ta, noin 8 yksikköä.

Liuosten valmistus

1. Pullon 1 sisältö käytetään laimentamatta. Liuos saatetaan lämpötilaan 20 – 25 °C ennen käyttöä.

2. Pullon 2 sisältö liuotetaan 4 ml:aan kahdesti tislattua vettä.

3. Pullon 3 sisältö liuotetaan 0,6 ml:aan kahdesti tislattua vettä. Liuos saatetaan lämpötilaan 20 – 25 °C ennen käyttöä.

Liuosten säilyvyys

Pullon 1 sisältö säilyy ainakin vuoden lämpötilassa + 4 °C; liuos 2 säilyy noin 3 viikkoa + 4 °C:ssa ja 2 kuukautta – 20 °C:ssa; liuos 3 säilyy 5 päivää + 4 °C:ssa.

3. VÄLINEET

3.1 Spektrofotometri, jolla voidaan mitata aallonpituudella 340 nm (NADH:n absorptiomaksimi). Jos tällaista spektrofotometriä ei ole, voidaan käyttää (suodatin)fotometriä, jolla voidaan mitata aallonpituuksilla 334 nm tai 365 nm. Koska mitataan absoluuttisia absorbanssiarvoja (ei kalibrointikäyrää, vaan vertailuna käytetään NADH:n ekstinktiokerrointa), laitteen aallonpituus- ja absorbanssiasteikot on kalibroitava.

3.2 Lasi- tai kertakäyttökyvettejä, joiden valotie on 1 cm.

3.3 Mikropipettejä, joilla voidaan käsitellä tilavuuksia välillä 0,01 – 2ml.

4. NÄYTTEEN VALMISTUS

D-omenahappo määritetään tavallisesti suoraan viinistä ilman värinpoistoa.

Koska D-omenahapon määrän kyvetissä pitää olla välillä 2 – 50 µg, on viininäyte laimennettava siten, että omenahappokonsentraatio on välillä 0,02 – 0,5 g/l tai välillä 0,02 – 0,3 g/l (laitteistosta riippuen).

Laimennustaulukko:

D-omenahapon arvioitu määrä litrassa		Laimennus vedellä	Laimennuskerroin F
Mittaus aallonpituudella:			
340 tai 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. SUORITUS

Spektrofotometrissä valitaan aallonpituus 340 nm ja absorbanssimittaukset tehdään kyveteissä, joiden valotie on 1 cm. Nolla-absorbanssi määritetään ilmaa vastaan (ei kyvettiä valotiessä) tai vettä vastaan.

Pipetoidaan kyvettiin, jonka valotie on 1 cm:

	Kontrolli	Näyte
liuosta 1	1,00 ml	1,00 ml
liuosta 2	0,10 ml	0,10 ml
tislattua vettä	1,80 ml	1,70 ml
näyteliuosta	—	0,10 ml

Sekoitetaan. Noin 6 minuutin kuluttua mitataan kontrolli- ja näyteliuoksen absorbanssi (A_1).

Lisätään:

	Kontrolli	Näyte
liuosta 3	0,05 ml	0,05 ml

Sekoitetaan. Odotetaan, että reaktio loppuu (noin 20 min) ja mitataan kontrolli- ja näyteliuoksen absorbanssi (A_2).

Lasketaan absorbanssien erotukset ($A_2 - A_1$) sekä kontrollille (ΔA_T) että näytteelle (ΔA_E). Vähennetään kontrollin absorbanssiero näytteen absorbanssierosta: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$

Huom. Entsyymivaikutuksen kesto voi vaihdella näyte-erien välillä. Suositeltu aika on vain ohjeellinen. Suositellaan, että vaikutusaikaa määritetään kullekin näyte-erälle.

D-omenahappo reagoi nopeasti. Jos entsyymiä on ylimäärin, se vaikuttaa myös L-viinihappoon, vaikka reaktionopeus on paljon pienempi. Tämän vuoksi esiintyy heikkoa sivureaktioita, jonka vaikutus voidaan korjata ekstrapoloimalla (ks. lisäys A).

6. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Konsentraatio milligrammoina litraa kohti lasketaan seuraavalla yleiskaavalla:

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

missä:

V = mittaliuoksen tilavuus millilitroina (tässä 2,95 ml)
v = näytteen tilavuus millilitroina (tässä 0,1 ml)
PM = mitattavan aineen molekyylimassa (tässä D-omenahappo = 134,09)
d = kyvetin valotie senttimetreinä (tässä 1 cm)
ε = NADH:n absorptiokerroin
aallonpituudella 340 nm = 6,3 (l $mmol^{-1}$ cm^{-1})
aallonpituudella 365 nm = 3,4 (l $mmol^{-1}$ cm^{-1})
aallonpituudella 334 nm = 6,18 (l $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Jos näytettä on laimennettu, tulos kerrotaan laimennuskertoimella.

D-omenahapon konsentraatio ilmoitetaan milligrammoina litraa kohti (mg/l) ilman desimaaleja.

7. LUOTETTAVUUS

Laboratorioiden väliset luotettavuuskokeet esitetään liitteessä B. Laboratorioiden välisestä kokeesta saatuja arvoja ei välttämättä voi käyttää, jos analyyttikonsentraatiot ja matriisit ovat erilaisia kuin lisäyksessä B käytetyt.

7.1 **Toistettavuus**

Absoluuttinen ero kahden yksittäisen tuloksen välillä, jotka sama määrityksentekijä on saanut samalla laitteistolla samasta näytemateriaalista hyvin lyhyin aikavälein, ei saa ylittää toistettavuusarvoa r enemmässä kuin 5 prosentissa määrityksistä.

Tämä r-arvo = 11 mg/l

7.2 **Uusittavuus**

Absoluuttinen ero kahden yksittäisen tuloksen välillä, jotka on saatu samasta näytemateriaalista kahdessa eri laboratoriossa, ei saa ylittää uusittavuusarvoa R enemmässä kuin 5 prosentissa määrityksistä.

Tämä R-arvo = 20 mg/l

8. HUOMAUTUKSIA

Mentelmän tarkkuudesta johtuen 50 mg/l:aa pienemmät D-omenahapon arvot on varmistettava jollakin toisella mittausmenetelmällä, joka perustuu johonkin toiseen periaatteeseen, esimerkiksi: Przyborski *et al.* (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215–218. 1993).

Kyvetissä oleva viininäyte ei saa olla suurempi kuin 0,1ml, jotta vältettäisiin polyfenoleista aiheutuva entsyymiaktiivisuuden inhibitio.

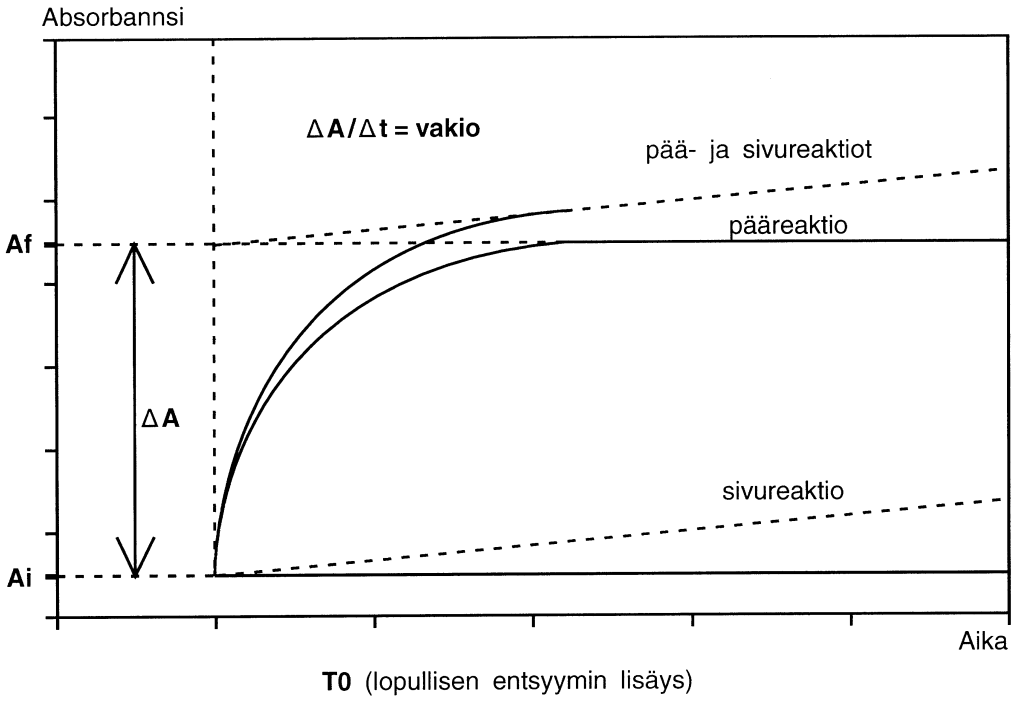
Lisäys A

Entsymaattisten sivureaktioiden huomioon ottaminen

Sivureaktiot johtuvat yleensä entsyymin toissijaisista reaktioista, muiden entsyymien läsnäolosta näytematriisissa tai yhden tai useamman matriisikomponentin reaktiosta entsyymireaktion jonkin kofaktorin kanssa.

Tavanomaisessa reaktiossa absorbanssi saavuttaa pysyvän arvon tietyn ajan, yleensä noin 10 – 20 minuutin kuluttua riippuen spesifisestä entsyymireaktiosta. Jos esiintyy toissijaisia reaktioita, absorbanssiarvo ei vakiinnu, vaan nousee ajan funktiona. Tämän tyyppistä reaktiota sanotaan sivureaktioksi.

Kun tällainen ongelma esiintyy, on suositeltavaa mitata liuoksen absorbanssi säännöllisin väliajoin (2 – 5 min) sen jälkeen kun kalibrointiliuos on saavuttanut lopullisen absorbanssin. Jos absorbanssi nousee säännöllisesti, tehdään 5 – 6 mittausta, minkä jälkeen suoritetaan graafinen tai laskennallinen ekstrapolaatio, jonka avulla saadaan liuoksen absorbanssi hetkellä, jolloin entsyymi lisättiin (T0). Tälle hetkelle ekstrapoloitua absorbanssieroa ($A_f - A_i$) käytetään substraattikonsentraation laskemiseen.



Kuva 1: Sivureaktio

Lisäys B

Laboratorioidenvälisen kokeen tulokset

Suoritusvuosi: 1995
Laboratorioiden lukumäärä: 8
Näytteiden määrä: 5, joihin oli lisätty D-omenahappoa

Näyte	A	B	C	D	E
Hyväksyttyjen laboratorioiden lukumäärä, kun oli poistettu ne laboratoriot, jossa oli saatu vääriä tuloksia	7	8	7	8	7
Niiden laboratorioiden lukumäärä, joissa oli saatu vääriä tuloksia	1	—	1	—	1
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	35	41	35	41	36
Keskiarvo ($\bar{\chi}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Toistettavuuden keskihajonta (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Toistettavuusraja (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Uusittavuuden keskihajonta (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Uusittavuusraja (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Näytetyypit:
A: punaviini; B: punaviini; C: valkoviini; D: valkoviini; E: valkoviini.”

LIITE II

"38. **SYAANIVETYHAPON JOHDANNAISET**

(*Huom.* Kemiallisten aineiden kuten kloramiini-T:n, pyridiinin, kaliumsyanidin, suolahapon ja fosforihapon käsittelyssä on noudatettava turvaohjeita. Käytetyt aineet on hävitettävä sopivalla tavalla asianmukaisia ekologisia määräyksiä ja asetuksia noudattaen. Happamaksi tehtyä viiniä tislattaessa vapautuvaa syaanivetyhappoa on varottava.)

1. PERIAATE

Vapaa kokonaissyaanivetyhappo vapautetaan happohydrolyysillä ja erotetaan tislaamalla. Sen annetaan reagoida kloramiini T:n ja pyridiinin kanssa, minkä jälkeen muodostunut glutakonihappodialdehydi määritetään kolorimetrisesti mittaamalla sininen väri, joka muodostuu sen reagoidessa 1,3-dimetyylibarbituurihapon kanssa.

2. VÄLINEET JA LAITTEET

2.1 **Tislauslaitteisto**

Käytetään tislauslaitteistoa, joka on kuvattu viinin alkoholinmääritystä varten.

2.2 500 ml:n tislauskolvi, jossa on vakiohios

2.3 Vesihaude, joka on säädetty 20 °C:een

2.4 Spektrofotometri, jolla voidaan mitata aallonpituudella 590 nm

2.5 Lasi- tai kertakäyttökyvettejä, joiden valotie on 20 mm

3. REAGENSSIT

3.1 Fosforihappo (H_3PO_4), 25 % (m/v)

3.2 Kloramiini T -liuos ($C_7H_7ClNNaO_2S$, $3H_2O$), 3 % (m/v)

3.3 1,3-dimetyylibarbituurihappoliuos: liuotetaan 3,658 g 1,3-dimetyyli-barbituurihappoa ($C_6H_8N_2O_3$) 15 ml:aan pyridiiniä ja 3 ml:aan suolahappoa (ρ_{20} = 1,19 g/ml) ja täytetään 50 ml:aan tislatulla vedellä

3.4 Kaliumsyanidi (KCN)

3.5 Kaliumjodidiliuos (KI) 10 % (m/v)

3.6 Hopeanitraattiliuos ($AgNO_3$), 0,1 M

4. SUORITUS

4.1 **Tislaus**

Lisätään 500 ml:n tislauskolviin (kohta 2.2) 25 ml viiniä, 50 ml tislattua vettä, 1 ml fosforihappoa (kohta 3.1) ja muutama lasihelmi. Kolvi kiinnitetään heti tislauslaitteistoon. Tisle johdetaan kapenevan putken kautta 50 ml:n mittapulloon, jossa on 10 ml vettä. Mittapullo upotetaan jääveteen. Kerätään 30 – 35 ml tislettä (ts. mittapullossa on kaikkiaan noin 45 ml nestettä).

Pestään jäähdytyslaitteen kapeneva putki muutamalla millilitralla tislattua vettä, lämmitetään tisle 20 °C:een ja täytetään merkkiin tislatulla vedellä.

4.2 **Mittaus**

Siirretään 25 ml tislettä 50 ml:n kartiokolviin, jossa on hiostulppa, lisätään 1 ml kloramiini T -liuosta (kohta 3.2) ja suljetaan tiiviisti. Täsmälleen 60 sekunnin kuluttua lisätään 3 ml 1,3-dimetyylibarbituurihappoliuosta (kohta 3.3), suljetaan tiiviisti ja odotetaan 10 min. Mitataan absorbanssi standardia vastaan (25 ml tislattua vettä tisleen sijasta) aallonpituudella 590 nm kyveteissä, joiden valotie on 20 mm.

5. KALIBROINTIKÄYRÄN MÄÄRITYS

5.1 **Kaliumsyanidin titraus hopeanitraatilla**

Liuotetaan 300 ml:n mittapullossa 0,2 g (tarkasti punnittu) KCN:a (kohta 3.4) 100 ml:aan tislattua vettä. Lisätään 0,2 ml kaliumjodidiliuosta (kohta 3.5) ja titrataan 0,1 M hopeanitraattiliuoksella (kohta 3.6), kunnes saadaan pysyvä kellertävä väri.

1 ml 0,1 M hopeanitraattia vastaa 13,2 mg:aa KCN:a, josta lasketaan näytteen KCN-pitoisuus.

5.2 **Kalibrointikäyrä**

5.2.1 *Kalibrointiliuosten valmistus*

Kun tunnetaan KCN-pitoisuus, joka on määritetty kohdan 5.1 mukaisesti, valmistetaan kalibrointiliuos, jossa on 30 mg/l syaanivetyhappoa (30 mg HCN ≅ 72,3 mg KCN). Liuos laimennetaan suhteessa 1/10.

Lisätään 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0 ml kalibrointiliuoksen laimennosta 100 ml:n mittapulloihin ja täytetään merkkiin tislatulla vedellä. Liuokset vastaavat 30:tä, 60:tä, 90:tä, 120:tä ja 150:tä µg/l syaanivetyhappoa.

5.2.2 *Määritys*

Otetaan 25 ml näin saaduista liuoksista ja jatketaan, kuten edellä kohdissa 4.1 ja 4.2 selostetaan.

Kuvaaja, jossa esitetään kalibrointiliuoksille saadut absorbanssiarvot vastaavien syaanivetyhappopitoisuuksien funktiona, on origon kautta kulkeva suora.

6. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Syaanivetyhappo ilmaistaan mikrogrammoina litraa kohti (µg/l) ilman desimaaleja.

6.1 **Laskeminen**

Syaanivetyhappopitoisuus luetaan kalibrointikäyrältä. Jos näytettä on laimennettu, saatu tulos kerrotaan laimennuskertoimella.

Toistettavuus (r) ja uusittavuus (R)

Valkoviini = r = 3,1 µg/l eli noin 6 % · x_i

R = 12 µg/l eli noin 25 % · x_i

Punaviini = r = 6,4 µg/l eli noin 8 % · x_i

R = 23 µg/l eli noin 29 % · x_i

x_i = HCN:n keskimääräinen pitoisuus viinissä

x_i = 48,4 µg/l valkoviinille

x_i = 80,5 µg/l punaviinille.”

LIITE III

44. ETYYLIKARBAMAATIN MÄÄRITYS VIINEISTÄ: SELEKTIIVINEN MENETELMÄ KAASUKROMATOGRAFIA-MASSASPEKTROMETRIALLA

(Soveltuu etyylikarbamaatin määritykseen, kun sen konsentraatio on välillä 10 – 200 µg/l)

(*Huomio*: Kemikaalien kuten etanolin ja asetonin sekä syöpää aiheuttavien aineiden kuten etyylikarbamaatin ja dikloorimetaanin käsittelyssä on noudatettava turvaohjeita. Käytetyt liuottimet on käsiteltävä tai hävitettävä niihin sovellettavien ympäristönsuojelua koskevien sääntöjen ja määräysten mukaisesti.)

A. **Menetelmän periaate**

Näytteeseen lisätään propyylikarbamaattia sisäiseksi standardiksi, liuosta laimennetaan vedellä, ja se pannaan 50 ml:n kiinteäfaasierotuspylvääseen. Etyylikarbamaatti ja propyylikarbamaatti eluoidaan dikloorimetaanilla.

Eluaatti konsentroidaan tyhjiöpyöröhaihdutuslaitteessa. Konsentraatti analysoidaan kaasukromatografisesti (GC), ja ilmaisimena käytetään massaspektrometriä fragmentometriamenetelmällä SIM-toimintamuodossa (Selected ions monitoring).

B. **Kromatografialaitteet ja -olosuhteet (esimerkiksi)**

a) Kaasukromatografi-massaspektrometri (GC/MS) ja mahdollisesti näytteenvaihtolaite ja tulostenkäsittelylaite tai vastaava.

Kapillaarikolonni, jossa on piihappojohdannaista, 30 m (*) × 0,25 mm sisähalkaisija, 0,25 µm tyyppiä Carbowax 20M.

Suoritus: injektori 180 °C, kantajakaasuna helium, virtaus 1 ml/min, 25 °C, injektio "Splitless / split"-menetelmällä.

Lämpötilaohjelmointi: 40 °C, 0,75 min, sen jälkeen 10 °C/min, kunnes saavutetaan 60 °C, sitten 3 °C/min, kunnes saavutetaan 150 °C (**), jatketaan 220 °C:een, ja pidetään 4,25 minuutin ajan 220 °C:ssa. Etyylikarbamaatin spesifinen retentioaika on 23 – 27 min ja propyylikarbamaatin 27 – 31 min.

Kaasukromatografin ja massaspektrometrin liitännän lämpötila 220 °C. Massaspektrometriparametrit säädetään manuaalisti perfluoritributyyliamiinilla ja optimoidaan matalammalle massaherkkyydelle, SIM-mittausmuoto, liuottimen eluutioaika ja mittausten alkamisaika 22 min, viipymisaika ionia kohti 100 ms.

b) Tyhjiöpyöröhaihdutuslaite tai Kuderna Danish -tyyppinen konsentrointilaitteisto.

(Huom. Näytteen etyylikarbamaatin saannon C(g) on oltava tässä vaiheessa välillä 90 – 110 %).

c) Kolvi — päärynänmuotoinen, 300 ml, yksi kaula, jossa hios.

d) Konsentrointiputki — 4 ml, asteikollinen, liitoskohdassa teflontiiviste ja tulppa.

C. **Reagenssit**

a) Asetoni — nestekromatografialaatua.

Huom. Jokaisesta erästä on tarkastettava GC/MS:llä, että siinä ei esiinny ioneja, joiden massavarausuhde m/z on 62, 74 ja 89.

b) Dikloorimetaani—

Huom. Jokaisesta erästä on tarkastettava 200-kertaisen konsentroinnin jälkeen GC/MS:llä, että siinä ei esiinny ioneja, joiden m/z on 62, 74 ja 89.

c) Etanoli — vedetön

(*) Tietyille erittäin täyteläisille viineille voi olla suositeltavaa käyttää 50 metriä pitkää kapillaarikolonnia.
(**) Tietyille erittäin täyteläisille viineille voi olla suositeltavaa käyttää lämpötilaohjelmointia, jossa lämpötila muuttuu 2 °C minuutissa.

d) Etyylikarbamaatti (EK), standardiliuokset

1. Kantaliuos — 1,00 mg/ml. Punnitaan 100 mg etyylikarbamaattia (puhtaus ≥ 99 %) 100 ml:n mittapulloon ja laimennetaan asetonilla.

2. Työstandardi — 10,0 µg/ml. Siirretään 1 ml kantaliuosta 100 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asetonilla.

e) Propyylikarbamaatti (PK), standardiliuokset

1. Kantaliuos — 1,00 mg/ml. Punnitaan 100 mg propyylikarbamaattia (reagenssilaatu) 100 ml:n mittapulloon ja laimennetaan asetonilla merkkiin asti.

2. Työstandardi — 10,0 µg/ml. Siirretään 1 ml kantaliuosta 100 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asetonilla.

3. Sisäinen standardi — 400 ng/ml. Siirretään 4 ml työstandardia 100 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin vedellä.

f) EK-PK-standardiliuokset

Laimennetaan työstandardeja (d) 2 ja (e) 2 dikloorimetaanilla siten, että saadaan:

1. (100 ng EK ja 400 ng PK)/ml,

2. (200 ng EK ja 400 ng PK)/ml,

3. (400 ng EK ja 400 ng PK)/ml,

4. (800 ng EK ja 400 ng PK)/ml,

5. (1 600 ng EK ja 400 ng PK)/ml.

g) Vertailunäyte — 100 ng EK/ml 40 % etanolissa.

Siirretään 1 ml työstandardiliuosta (d) 2 100 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin 40 % etanolilla.

h) Kiinteäfaasiuuttokolonni — Kertakäyttöisiä, pakattu piimaalla, tilavuus 50 ml.

Huom. Jokaisesta kolonnierästä on tarkastettava etyyli- ja propyylikarbamaatin saanto ja se, ettei niissä esiinny ioneja, joiden m/z on 62, 74 tai 89. Valmistetaan vertailunäyte, jossa on 100 ng EK/ml (g). Analysoidaan 5,00 ml vertailunäytettä kohtien D(a), E ja F mukaisesti. Saanto välillä 90 – 110 ng EK/ml on tyydyttävä. Absorbenteista, joiden hiukkasten halkaisijat vaihtelevat, eluutio tapahtuu usein hitaasti, mikä vaikuttaa etyyli- ja propyylikarbamaatin saantoon. Jos saantoarvoa 90 – 110 % mittausnäytteen arvosta ei saada useiden yritysten jälkeen, on vaihdettava kolonni tai käytettävä korjattua kalibrointikäyrää etyylikarbamaatin saannon määrittämiseksi. Korjattu kalibrointikäyrä saadaan käyttämällä kohdassa (f) esitetyllä tavalla valmistettuja standardiliuoksia, joissa on käytetty 40 % etanolia dikloorimetaanin sijasta.

Analysoidaan 1 ml kalibrointistandardiliuosta kuten on esitetty kohdissa D, E ja F.

Laaditaan uusi kalibrointikäyrä käyttämällä uutettujen standardien EK/PK-suhdetta.

D. **Mittausnäytteen valmistus**

Analysoitavaa näytemateriaalia pannaan kahteen 100 ml:n dekanterilasiin seuraavat määrät:

a) Viinit, joissa on yli 14 tilavuus-% alkoholia: 5,00 ml ± 0,01 ml.

b) Viinit, joissa on korkeintaan 14 tilavuus-% alkoholia: 20,00 ml ± 0,01 ml.

Kuhunkin dekanterilasiin lisätään 1 ml sisäistä PK-standardiliuosta C(e) 3 ja vettä siten, että kokonaistilavuus on 40 ml (tai 40 g).

E. **Uutto**

Uutto tehdään vetokaapissa, jossa on riittävä ilmanvaihto.

Kohdassa D valmistettu liuos lisätään uuttokolonniin.

Dekanterilasi huuhdellaan 10 ml:lla vettä ja huuhteluvesi lisätään kolonniin.

Annetaan nesteen imeytyä kolonniin 4 minuutin ajan, ja eluoidaan 2 × 80 ml:lla dikloorimetaania. Eluaatti kerätään 300 ml:n kartiokolviin.

Eluaatti haihdutetaan 2 – 3 ml:aan pyöröhaihduttajalla 30 °C:n vesihauteessa. (*Huom.* Ei saa antaa haihtua kuiviin).

Siirretään konsentroitu jäännös 4 ml:n asteikolliseen putkeen Pasteur-pipetillä.

Huuhdellaan kolvi 1 ml:lla dikloorimetaania ja siirretään huuhteluneste putkeen. Näyte konsentroidaan 1 ml:ksi heikossa typpivirtauksessa.

Jos käytetään näytteenvaihtajaa, siirretään konsentraatti näytteenvaihtajapulloon GC/MS-analyysiä varten.

F. **GC/MS-analyysi**

a) Kalibrointikäyrä

Injektoidaan 1 µl kutakin kalibrointistandardiliuosta C (f) GC/MS-laitteistoon. Kuvaajassa esitetään y-akselilla etyylikarbamaatin ja propyylikarbamaatin m/z 62 -ionin pinta-alojen suhde ja x-akselilla etyylikarbamaatin määrä ng/ml (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml).

b) Etyylikarbamaatin määrittäminen

Injektoidaan 1 µl konsentroitua uutetta E GC/MS-laitteistoon ja lasketaan etyylikarbamaatin ja propyylikarbamaatin m/z 62 -ionin pinta-alojen suhde. Uutteen etyylikarbamaattikonsentraatio (ng/ml) määritetään sisäisen standardin kalibrointikäyrän avulla. Etyylikarbamaatin konsentraatio näytteessä (ng/ml) lasketaan jakamalla uutteen etyylikarbamaattimäärä CE (ng/ml) näytteen tilavuudella (ml).

c) Etyylikarbamaatin puhtauden todentaminen

Tarkistetaan, esiintyvätkö ionien m/z 62, 74 ja 89 signaalit etyylikarbamaatin retentioajan kohdalla. Nämä signaalit ovat luonteenomaisia tärkeimmille fragmenteille $(M - C_2H_2)^+$ ja $(M - CH_3)^+$ sekä molekyyli-ionille (M). Etyylikarbamaatin läsnäolon vahvistaa se, että näiden ionien vasteiden suhteet poikkeavat enintään 20 % etyylikarbamaattistandardin vastaavien ionien suhteesta. Uutetta on mahdollisesti konsentroitava uudelleen, jotta saadaan riittävä signaali ionille m/z 89.

G. **Yhteistyölaboratorioiden tulosten analyysi**

Taulukossa 1 esitetään esimerkkinäytteelle ja kahdelle viinityypille saadut yksittäiset tulokset.

Cochranin testin seurauksena eliminoitiin kahden määrityksen tulokset (yksi viinille, jonka alkoholipitoisuus on yli 14 tilavuus-% ja yksi viinille, jonka alkoholipitoisuus on korkeintaan 14 tilavuus-%). Nämä tulokset olivat peräisin eri laboratorioista.

Uusittavuus näyttää pienenevän etyylikarbamaattikonsentraation kasvaessa.

Alkoholijuomien Sisältämän etyylikarbamaatin GC-MS-määrityksen suoritusarvot

Näyte	EK-konsentraatio (ng/ml)	Lisätyn EK:n saanto (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Viini, jonka alkoholipit. on yli 14 tilavuus-%	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
Viini, jonka alkoholipit. on korkeintaan 14 tilavuus-%	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