31999R0761

KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 761/1999,

12. aprill 1999,

millega muudetakse määrust (EMÜ) nr 2676/90, millega nähakse ette ühenduse veinianalüüsi meetodid

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 16. märtsi 1987. aasta määrust (EMÜ) nr 822/87 veinituru ühise korralduse kohta, [1] viimati muudetud määrusega (EÜ) nr 1627/98, [2] eriti selle artiklit 74,

ning arvestades, et:

komisjoni määruse (EMÜ) nr 2676/90 [3] (viimati muudetud määrusega (EÜ) nr 822/97 [4]) lisas kirjeldatakse analüüsimeetodeid; 20. peatükis kirjeldatud D-õunhappe analüüsimeetod on osutunud ebatäpseks ning on välja töötatud uus ja täpsem meetod; tsüaniidi derivaatide analüüsimiseks on välja töötatud uus meetod, mis on tundlikum ja mida on lihtsam kohaldada; rahvusvahelisel tasandil on välja töötatud uus meetod etüülkarbamaadi määramiseks veinis; kõnealused kolm meetodit on kinnitatud vastavalt rahvusvaheliselt tunnustatud kriteeriumidele; nende meetodite abil on võimalik tagada veini kvaliteedi ja ehtsuse tõhusam kontroll ning vältida vaidlusi, mis on tingitud aegunud ja mitte eriti usaldusväärsete analüüsimeetodite kohaldamisest; uute meetodite kirjeldused on heaks kiitnud Rahvusvaheline Veiniamet; need meetodid tuleks inkorporeerida kõnealusesse määrusesse;

käesoleva määrusega ettenähtud meetmed on kooskõlas veinituru korralduskomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määruse (EMÜ) nr 2676/90 lisa muudetakse järgmiselt:

1. 20. peatükk (D-õunhape) asendatakse käesoleva määruse I lisaga;
2. 38. peatükk (Tsüaniidi derivaadid) asendatakse käesoleva määruse II lisaga;
3. käesoleva määruse III lisa lisatakse 44. peatükina.

Artikkel 2

Käesolev määrus jõustub seitsmendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Ühenduste Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 12. aprill 1999

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Franz FISCHLER

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

I LISA

"20. **D-ÕUNHAPE**

(ensümaatiline meetod)

1. PÕHIMÕTE

D-malaadi dehüdrogenaasi (D-MDH) manulusel oksüdeeritakse D-õunhape (D-malaat) nikotiinamiidadeniindinukleotiidi (NAD) toimel oksaloatsetaadiks. Moodustunud oksaloatsetaat lagundatakse püruvaadiks ja süsinikdioksiidiks.

$$\text{D-malaat} + NAD^+ \xrightleftharpoons{\text{D-MDH}} \text{püruvaat} + CO_2 + NADH + H^+$$

Tekkinud NADH kogus on võrdeline D-õunhappe algkogusega ning seda määratakse neelduvuse järgi 334, 340 või 365 nm juures.

2. REAKTIIVID

Reaktiivide komplekt umbes 30 määramiseks:

a) pudel 1: ligikaudu 30 ml lahust, mis sisaldab Hepes-puhvrit [*N*-(2-hüdroksüetüül)piperasiin-*N*'-2-etaansulfoonhape], pH 9,0 ja stabilisaatorid;

b) pudel 2: ligikaudu 210 mg NAD-lüofilisaati;

c) pudel 3 (kolm pudelit): D-MDH-lüofilisaat, ligikaudu 8 ühikut igas pudelis.

Lahuste valmistamine

1. Pudelis 1 olevat lahust ei lahjendata. Enne kasutamist reguleeritakse lahuse temperatuur 20–25 °C-le.

2. Pudeli 2 sisu lahjendatakse 4 ml bidestilleeritud veega.

3. Ühe pudeli 3 sisu lahjendatakse 0,6 ml bidestilleeritud veega. Enne kasutamist reguleeritakse lahuse temperatuur 20–25 °C-le.

Lahuste püsivus

Pudeli 1 sisu püsib stabiilsena +4 °C juures ühe aasta; lahus 2 püsib stabiilsena +4 °C juures kolm nädalat ja –20 °C juures kaks kuud; lahus 3 püsib stabiilsena +4 °C juures viis päeva.

3. SEADMED

3.1. Spektofotomeeter, mis võimaldab teha mõõtmisi lainepikusel 340 nm (sellel lainepikkusel on NADH neeldumine maksimaalne). Kui kõnealust spektrofotomeetrit ei ole, võib kasutada mõnda muud mittepideva spektriga valgusallikat omavat spektrofotomeetrit, mis võimaldab teha mõõtmisi 334 või 365 nm juures. Kuna tehakse absoluutse neelduvusega mõõtmisi (s.o mitte kaliibrimislahustega, vaid võrdluseks kasutatakse NADH ekstinktsiooniteguri), tuleb kontrollida seadme lainepikkuse skaalasid ja spektraalset neelduvust.

3.2. Klaasküvetid, mille optilise tee pikkus on 1 cm (võib kasutada ühekordseks kasutamiseks ettenähtud küvette).

3.3. Mikropipetid, mis võimaldavad mõõta 0,01–2 ml.

4. PROOVI ETTEVALMISTAMINE

D-õunhappe analüüs tehakse harilikult otse veiniga, ilma eelneva värvitustamiseta.

D-õunhappe kogus küvetis peaks olema 2-50 µg. Veini tuleb seega lahjendada nii, et D-õunhappe kontsentratsioon oleks vastavalt 0,02-0,5 g/l või 0,02-0,3 g/l (olenevalt kasutatavast seadmest).

Lahjenduste tabel:

D-malaadi hinnanguline kogus liitri kohta		Lahjendamine veega	Lahjendusaste
Mõõdetud lainepikkusel:			
340 või 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. TÖÖ KÄIK

Spektofotomeetriga, mis on reguleeritud lainepikkusele 340 nm, määratakse 1 cm küvettide abil neelduvus, kasutades nullneelduvuse määramiseks kas õhku (optilisele teele ei panda küvetti) või vett.

Pipetitakse küvettidesse:

	Võrdlusküvett	Prooviküvett
Lahus 1	1,00 ml	1,00 ml
Lahus 2	0,10 ml	0,10 ml
Bidestilleeritud vesi	1,80 ml	1,70 ml
Uuritav proov	—	0,10 ml

Segatakse ja ligikaudu kuue minuti möödudes mõõdetakse võrdlus- ja katselahuste neelduvus (A_1).

Lisatakse:

	Võrdlusküvett	Prooviküvett
Lahus 3	0,05 ml	0,05 ml

Segatakse; oodatakse, kuni reaktsioon lakkab (ligikaudu 20 minutit) ja mõõdetakse võrdlus- ja katselahuste neelduvus (A_2).

Arvutatakse võrdluslahuste (ΔA_T) ja proovilahuste (ΔA_E) neelduvuste erinevus (A_2 - A_1). Lõpuks arvutatakse nende erinevuste vahe: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Märkus: Ensümaatiliste protsesside lakkamiseks vajalik aeg võib eri partiide puhul olla erinev. Eespool nimetatud aeg on antud üksnes juhindumiseks ja see soovitatakse määrata eraldi iga partii puhul.

D-õunhape reageerib kiiresti. Ensüüm muundab ka L-viinhapet, kuigi tunduvalt aeglasemalt. See seletab nõrka kõrvalreaktsiooni, mida saab korrigeerida ekstrapoleerimise teel (vt A liidet).

6. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Milligrammides liitri kohta väljendatava kontsentratsiooni arvutamise üldvalem on järgmine:

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

kus:

V = katselahuse kogus milliliitrites (2,95 ml)

v = proovi kogus milliliitrites (0,1 ml)

PM = määratava aine molekulmass (D-õunhappe puhul PM = 134,09)

d = küveti optilise tee pikkus sentimeetrites (1 cm)

ε = NADH neeldumistegur:

340 nm juures ε 6,3 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})

365 nm juures ε 3,4 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})

334 nm juures ε 6,18 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Kui proovi on ettevalmistamise käigus lahjendatud, korrutatakse tulemus lahjendusastmega.

D-õunhappe kontsentratsioon väljendatakse milligrammides liitri kohta (mg/l) ilma kümnendkohtadeta.

7. TÄPSUS

Meetodi täpsuse kohta tehtud laboritevahelise katse andmed on kokku võetud B liites. Laboritevahelisest katsest tuletatud näitajaid tohib kohaldada üksnes B liites esitatud analüüdi kontsentratsioonide ja põhiainete suhtes.

7.1. **Korratavus**

Sama analüüsija poolt identse materjali ja samade seadmetega tehtud kahe teineteisele võimalikult lühikese intervalliga järgneva katse üksiktulemuste absoluutne erinevus ei ületa korratavuse näitajat r rohkem kui 5 % juhtudest.

r = 11 mg/l.

7.2. **Reprodutseeritavus**

Kahes eri laboris identse materjaliga tehtud kahe katse üksiktulemuste absoluutne erinevus ei ületa reprodutseeritavuse näitajat R rohkem kui 5 % juhtudest.

R = 20 mg/l.

8. MÄRKUSED

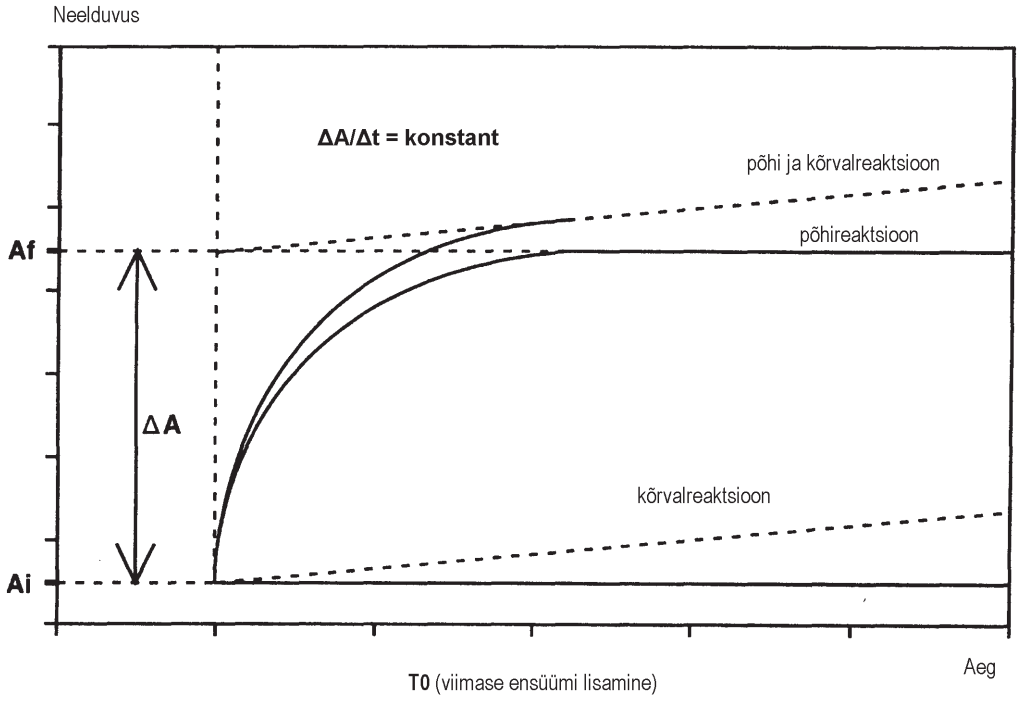
Käesoleva meetodi täpsusastet silmas pidades tuleks D-õunhappe näitajaid, mis osutuvad väiksemaks kui 50 mg/l, kinnitada vajaduse korral muu analüüsimeetodiga, kasutades muud mõõtmispõhimõtet, näiteks Przyborski *et al.* (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215–218. 1993).

Veiniproovi ei tohiks küvetis olla rohkem kui 0,1 ml, et vältida polüfenoolidest põhjustatud võimalikku ensümaatilise aktiivsuse inhibitsiooni.

A liide

Kõrvalreaktsioonide arvestamine

Kõrvalreaktsioone põhjustavad harilikult ensüümi sekundaarreaktsioonid, muud ensüümid proovi põhiaines või ühe või mitme põhiaine elemendi ja kaasmõjuri vastastikune mõju ensümaatilises reaktsioonis.



Joonis 1. Kõrvalreaktsioon

Tavapärase reaktsiooni puhul saavutab neeldumine püsiva väärtuse pärast teatavat aega, üldjuhul 10-20 minuti möödumisel, olenevalt konkreetse ensümaatilise reaktsiooni kiirusest. Kuid sekundaarreaktsiooni ilmnemise korral ei saavuta neeldumine püsivat väärtust, vaid suureneb ühtlaselt aja möödudes. Sellist protsessi nimetatakse tavapäraselt kõrvalreaktsiooniks.

Kõrvalreaktsiooni ilmnemise korral tuleks lahuse neelduvust mõõta korrapäraselt (iga 2–5 minuti järel), kui standardlahuse neelduvuse lõpliku väärtuse saavutamiseks vajalik aeg on möödunud. Kui neelduvus ühtlaselt suureneb, tuleks teha viis või kuus mõõtmist ning ekstrapoleerida tagasi graafiku või arvutuse abil, et määrata neelduvus, mis oleks registreeritud viimase ensüümi lisamisel (T0). Substraadi kontsentratsioon arvutatakse sel ajal ekstrapoleeritud neelduvuse erinevuse põhjal (Af-Ai).

B liide

Laboritevahelise katse statistilised tulemused

Laboritevahelise katse tegemise aasta: 1995

Laborite arv: 8

Proovide arv: 5 D-õunhappe lisamisega

Proov	A	B	C	D	E
Laborite arv pärast nende laborite elimineerimist, kus saadi kõrvalekalduvaid tulemusi	7	8	7	8	7
Nende laborite arv, kus saadi kõrvalekalduvaid tulemusi	1	–	1	–	1
Tunnustatud tulemuste arv	35	41	35	41	36
Keskmine väärtus ($\bar{\chi}$)(mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Korratavuse standardhälve (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Korratavuse suhteline standardhälve (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Korratavuse piirnorm (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Reprodutseeritavuse standardhälve (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Reprodutseeritavuse piirnorm (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Proovide tüübid:

A: punane vein; B: punane vein; C: valge vein; D: valge vein; E: valge vein;”

II LISA

"38. **TSÜANIIDI DERIVAADID**

(Ettevaatust: klooramiin T, püridiini, kaaliumtsüaniidi, soolhappe ja fosforhappe puhul tuleb järgida kemikaalide käitlemise ohutusnõudeid. Kasutatud tooted tuleb likvideerida nõuetekohaselt, vastavalt kehtivatele keskkonnaalastele eeskirjadele. Ettevaatust hapestatud veini destilleerimisel vabaneva vesiniktsüaniidhappega.)

1. PÕHIMÕTE

Kogu veinis sisalduv vaba vesiniktsüaniidhape vabastatakse happelise hüdrolüüsiga ja eraldatakse destilleerimisel. Pärast reageerimist klooramiin-T ja püridiiniga määratakse moodustunud glükoondialdehüüd kindlaks kolorimeetria abil sinaka värvuse põhjal, mis tekib reaktsioonil 1,3-dimetüülbarbituurhapega.

2. SEADMED

2.1. **Destilleerimisaparaat**

Kasutatakse destilleerimisaparaati, mida on kirjeldatud veini alkoholisisalduse määramise juures

2.2. Standardse lihvühendusega 500 ml ümarkolb

2.3. Termostateeritud veevann 20 °C juures

2.4. Spektofotomeeter, mille abil saab mõõta neelduvust lainepikkusel 590 nm

2.5. Klaasküvetid või ühekordseks kasutuseks ettenähtud küvetid optilise tee pikkusega 20 mm

3. REAKTIIVID

3.1. Fosforhappe (H_3PO_4) 25 (massi/mahu)protsendi lahus

3.2. Klooramiin-T ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$) 3 (massi/mahu)protsendi lahus

3.3. 1,3-dimetüülbarbituurhappe lahus: 3,658 g 1,3-dimetüülbarbituurhapet ($C_6H_8N_2O_3$) lahustatakse 15 ml püridiinis ja 3 ml soolhappes (ρ_{20} = 1,19 g/ml) ning lisatakse 50 ml destilleeritud vett

3.4. Kaaliumtsüaniid (KCN)

3.5. Kaaliumjodiidi (KI) 10 (massi/mahu)protsendi lahus

3.6. 0,1 M hõbenitraadi lahus ($AgNO_3$)

4. TÖÖ KÄIK

4.1. **Destilleerimine**

25 ml veini, 50 ml destilleeritud vett, 1 ml fosforhapet (3.1) ja mõned klaashelmed pannakse 500 ml kolbi (2.2). Kolb asetatakse kohe destilleerimisaparaadile. Koonusekujulise toru abil viiakse destillaat 50 ml mõõtekolbi, milles on 10 ml vett. Mõõtekolb asetatakse jäävette. Mõõtekolbi kogutakse 30-35 ml destillaati (või kokku umbes 45 ml vedelikku).

Kondensaatori koonusekujuline toru loputatakse mõne milliliitri destilleeritud veega, viiakse destillaat temperatuurini 20 °C ja täiendatakse destilleeritud veega kuni märgini.

4.2. **Mõõtmine**

25 ml destillaati pannakse ümara klaaskorgiga 50 ml Erlenmeyeri kolbi, lisatakse 1 ml klooramiin-T lahust (3.2) ja suletakse korgiga. Täpselt 60 sekundi möödudes lisatakse 3 ml 1,3-dimetüülbarbituurhappe lahust (3.3), suletakse korgiga ja jäetakse 10 minutiks seisma. Seejärel mõõdetakse neelduvus kontrollproovi suhtes (25 ml destilleeritud vett 25 ml destillaadi asemel) lainepikkusel 590 nm küvettides optilise tee pikkusega 20 mm.

5. KALIIBRIMISKÕVERA KINDLAKSMÄÄRAMINE

5.1. **Kaaliumtsüaniidi argentomeetriline tiitrimine**

300 ml mõõtekolbi kaalutakse täpselt umbes 0,2 g KCN (3.4) ja lahustatakse 100 ml destilleeritud vees. Lisatakse 0,2 ml kaaliumjodiidi lahust (3.5) ja tiitritakse 0,1 M hõbenitraadi lahusega kuni püsiva kollaka värvuse saavutamiseni.

Võttes aluseks, et 1 ml 0,1 M hõbenitraadi lahust vastab 13, 2 mg KCN-le, arvutatakse KCN proovi kontsentratsioon.

5.2. **Standardkõver**

5.2.1. *Standardlahuste valmistamine*

Pärast KCN kontsentratsiooni kindlakstegemist vastavalt punktile 5.1 valmistatakse standardlahus, mis sisaldab 30 mg/l vesiniktsüaniidhapet (30 mg HCN 72,3 mg KCN). Lahjendatakse lahus suhtes 1/10.

1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml ja 5,0 ml lahjendatud proovilahust kantakse 100 ml mõõtekolbidesse ja täiendatakse destilleeritud veega kuni märgini. Valmistatud lahused sisaldavad vastavalt 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg ja 150 µg vesiniktsüaniidhapet liitri kohta.

5.2.2. *Tiitrimine*

Saadud lahustest võetakse 25 ml proovid ja jätkatakse vastavalt eespool esitatud punktidele 4.1 ja 4.2.

Standardlahuste neelduvuse näitajad vesiniktsüaniidhappe sisalduse funktsioonina peaksid moodustama nullpunkti läbiva sirgjoone.

6. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Vesiniktsüaniidhappe sisaldus väljendatakse mikrogrammides liitri kohta (µg/l) ilma kümnendkohtadeta.

6.1. **Arvutusmeetod**

Vesiniktsüaniidhappe sisaldus loetakse kaliibrimiskõveralt. Kui proovi on lahjendatud, korrutatakse tulemus lahjendusastmega.

Korratavus (r) ja reprodutseeritavus (R)

Valge vein: = r = 3,1 µg/l või ligikaudu 6 % · x_i

R = 12 µg/l või ligikaudu 25 % · x_i

Punane vein: = r = 6,4 µg/l või ligikaudu 8 % · x_i

R = 23 µg/l või ligikaudu 29 % · x_i

x_i = HCN keskmine kontsentratsioon veinis

x_i = 48,4 µg/l valge veini puhul

x_i = 80,5 µg/l punase veini puhul.”

III LISA

44.

ETÜÜLKARBAMAADI MÄÄRAMINE VEINIS: GAASIKROMATOGRAAFIAL/MASSISPEKTROMEETRIAL PÕHINEV VALIKMEETOD

(etüülkarbamaadi määramiseks kontsentratsioonil 10-200 µg/l)

(Ettevaatust: etanooli, atsetooni ja kantserogeensete toodete (karbamaadi ja diklorometaani) puhul tuleb järgida kemikaalide käitlemise ohutusnõudeid. Kasutatud lahused tuleb likvideerida nõuetekohaselt, vastavalt kehtivatele keskkonnaalastele eeskirjadele.)

A. **Põhimõte**

Proovile lisatakse sisestandardina propüülkarbamaati, lahus lahjendatakse veega ja asetatakse 50 ml tahkefaasilisse ekstraktsioonikolonni. Etüülkarbamaat ja propüülkarbamaat elueeritakse diklorometaani abil.

Eluaat kontsentreeritakse vaakumpöördaurustis. Kontsentraati analüüsitakse gaasikromatograafia abil. Määramine toimub massispektromeetria abil, kasutades fragmentomeetriat SIM-meetodil (*selected ion monitoring*, ioonide valikkontroll).

B. **Seadmed ja kromatograafilised tingimused (näide)**

a) Gaasikromatograaf/massispektromeeter (GC/MS) ning vajaduse korral proovifilter ja andmetöötlussüsteem või selle ekvivalent

Sulatatud ränidioksiidist kapillaarkolonn 30 m (*) × 0,25 mm (sisediameeter), Carbowax 20M kile paksusega 0,25 µm

Töö käik: injektor 180 °C, vektorgaas heelium 1 ml/min temperatuuril 25 °C, sisseviimine jaotatud/jaotamata vooluga meetodil

Temperatuurirežiim: 40 °C 0,75 minutit, seejärel 10 °C/min kuni temperatuurini 60 °C, seejärel 3 °C/min kuni temperatuurini 150 °C (**), tõstetakse temperatuurini 220 °C ja hoitakse sellel 4,25 minutit. Etüülkarbamaadi eripeetumisaeg on 23-27 minutit, propüülkarbamaadil 27-31 minutit.

Gaasikromatograafi/spektromeetri (GC/MS) liides: ülekandetoru temperatuuril 220 °C. Massispektromeetri parameetrid käsitsi reguleeritud perfluorotributüülamiiniga ja optimeeritud madalale massitundlikkusele, SIM-mõõtemeetod, lahustumisaeg ja kogumise algusaeg 22 minutit, viivitusaeg iooni kohta 100 ms.

b) Vaakumpöördaurusti või Kuderna Danish tüüpi kontsentratsioonisüsteem.

(*NB:* uuritava proovi etüülkarbamaadi saagise määr C(g) peab protsessi vältel olema 90-110 %.)

c) Kolb - 300 ml, pirnikujuline, ühe lihvitud kaelaga

d) Kontsentreerimistoru - 4 ml, gradueeritud, tefloniga kaetud muhvi ja korgiga

C. **Reaktiivid**

a) Atsetoon - LC-kvaliteet

(*NB:* enne kasutamist GC/MS-is kontrollitakse iga partiid, et selles ei oleks erilaenguga (m/z) 62, 74 ja 89 ioonide signaale.)

b) Diklorometaan

(*NB:* enne kasutamist GC/MS-is analüüsitakse pärast 200kordset kontsentreerimist iga partiid, et selles ei oleks erilaenguga (m/z) 62, 74 ja 89 ioonide signaale.)

c) Etanool - veevaba

(*) Teatavate eriti täidlaste veinide puhul võib olla soovitav kasutada 50 ml kapillaarkolonni.
(**) Teatavate eriti täidlaste veinide puhul võib olla soovitav tõsta temperatuuri 2 °C/min.

d) Etüülkarbamaadi (EK) standardlahused

1. Põhilahus - 1,00 mg/ml. 100 mg EK (puhtus ≥ 99 %) kaalutakse 100 ml mõõtekolbi ja lahjendatakse atsetooniga.

2. Tööstandardlahus - 10,0 µg/ml. 1 ml EK põhilahust kantakse 100 ml mõõtekolbi ja lahjendatakse atsetooniga kuni märgini.

e) Propüülkarbamaadi (PK) standardlahused

1. Põhilahus - 1,00 mg/ml. 100 mg PK (analüüsipuhas) kaalutakse 100 ml mõõtekolbi ja lahjendatakse atsetooniga kuni märgini.

2. Tööstandardlahus – 10,0 µg/ml. 1 ml PK põhilahust kantakse 100 ml mõõtekolbi ja lahjendatakse atsetooniga kuni märgini.

3. PK sisestandardlahus - 400 ng/ml. 4 ml PK tööstandardlahust kantakse 100 ml mõõtekolbi ja lahjendatakse veega kuni märgini.

f) Kaliibritud EK ja PK standardlahused

EK tööstandardlahus (d.2) ja PK tööstandardlahus (e.2) lahjendatakse diklorometaaniga järgmiselt:

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) Uuritav proov - 100 ng EK/ml 40 % etanoolis

1 ml EK tööstandardlahust (d.2) kantakse 100 ml mõõtekolbi ja lahjendatakse 40 % etanooliga kuni märgini.

h) Tahkefaasiline ekstraktsioonikolonn - ühekordselt kasutatavast materjalist, eelnevalt kobediatomiidiga pakitud, maht 50 ml

NB: Enne analüüsi kontrollitakse iga ekstraktsioonikolonnide partii puhul EK ja PK saagist ning seda, et partiis ei oleks erilaenguga (m/z) 62, 74 ja 89 ioonide signaale. Valmistatakse uuritav proov (g) 100 ng EK/ml. 5,00 ml uuritavat proovi analüüsitakse vastavalt punkti D alapunktile a ning punktidele E ja F. Saagis 90-110 ng EK/ml on rahuldav. Ebakorrapärase osakeste läbimõõduga absorbendid võivad põhjustada aeglast voolu, mis mõjutab EK ja PK saagist. Kui pärast mitut katset ei saada 90-110 % uuritava proovi väärtusest, vahetatakse EK kvantifitseerimiseks kolonni või kasutatakse korrigeeritud kaliibrimiskõverat. Korrigeeritud kaliibrimiskõvera saamiseks valmistatakse standardlahused vastavalt punktile f, kasutades diklorometaani asemel 40 % etanooli.

1 ml kaliibritud standardlahust analüüsitakse vastavalt punktidele D, E ja F.

Koostatakse uus kaliibrimiskõver, kasutades ekstraheeritud standardite EK/PK suhet.

D. **Uuritava proovi ettevalmistamine**

Kahte 100 ml keeduklaasi pannakse järgmised katsematerjali kogused:

a) veinid alkoholisisaldusega üle 14 mahuprotsendi: 5,00 ± 0,01 ml;

b) veinid alkoholisisaldusega kuni 14 mahuprotsenti: 20,00 ± 0,01 ml.

Kummassegi keeduklaasi lisatakse 1 ml PK sisestandardlahust (C.e.3) ja vett mahuni 40 ml (või 40 g).

E. **Ekstraheerimine**

Ekstraheerida tuleks nõuetekohase ventilatsiooniga tõmbekapis.

Punkti D kohaselt valmistatud proov kantakse ekstraktsioonikolonni.

Keeduklaas loputatakse 10 ml veega ja loputusvesi kallatakse kolonni.

Vedelik jäetakse neljaks minutiks absorbeeruma. Elueeritakse 2 × 80 ml diklorometaaniga. Eluaat kogutakse 300 ml Erlenmeyeri kolbi.

Eluaat aurustatakse 2–3 ml-ni veevanni kohal vaakumpöördaurustis temperatuuril 30 °C. (NB: mitte lasta kuivaks keeda.)

Kontsentreeritud jääk kantakse Pasteur pipetiga 4 ml büretti.

Kolb loputatakse 1 ml diklorometaaniga ja loputusvedelik kantakse büretti. Proov kontsentreeritakse nõrga lämmastikujoaga 1 ml-ni.

Vajaduse korral kantakse kontsentraat GC/MS-analüüsi jaoks automaatproovivõtja kolbi.

F. **GC/MS-analüüs**

a) Kaliibrimiskõver

1 µl iga kalibreeritud standardlahust (C.f) süstitakse GC/MSi. Graafiku koostamiseks kantakse vertikaalteljele EK ja PK pindalade suhe erilaenguga (m/z) 62 ioonide signaalide puhul ning horisontaalteljele EK kogus ng/ml (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml).

b) EK kvantifikatsioon

1 µl punkti E kohaselt valmistatud kontsentreeritud ekstrakti süstitakse GC/MS-süsteemi ja arvutatakse EK-PK pindalade suhe erilaenguga (m/z) 62 ioonide puhul. Määratakse EK kontsentratsioon (ng/ml) ekstraktis, kasutades sisestandardi kaliibrimiskõverat. Arvutatakse EK kontsentratsioon uuritavas proovis (ng/ml), jagades ekstraktis sisalduva EK koguse (ng) uuritava proovi ruumalaga (ml).

c) EK puhtuse kinnitamine

Määratakse kindlaks, kas EK retentsiooni ajal ilmnevad erilaenguga (m/z) 62, 74 ja 89 ioonide signaalid. Kõnealused signaalid on peamiste fragmentide $(M - C_2H_2)^+$ ja $(M - CH_3)^+$ ning molekulaarioon $(M)^+$ omadused. EK olemasolu on kinnitatud, kui kõnealuste ioonide sisaldus on kuni 20 % etüülkarbamaadi standardi vastavast sisaldusest. Piisava signaali saamiseks erilaenguga (m/z) 89 ioonide puhul võib olla vaja ekstrakti veelgi kontsentreerida.

G. **Ringtest**

Tabelis on esitatud näidisproovi ja mõlema veinitüübi puhul saadud üksiktulemused.

Cochrani katse tulemusel kõrvaldati üks tulemustepaar nii üle 14 mahuprotsendi alkoholisisaldusega veini puhul kui ka kuni 14 mahuprotsendi alkoholisisaldusega veini puhul, kusjuures need tulemused pärinesid kahest eri laborist.

Etüülkarbamaadi kontsentratsiooni suurenedes suhteline reprodutseeritavus (RSD_R) väheneb.

Alkohoolsete jookide etüülkarbamaadi (EK) sisalduse määramiseks kasutatava GC/MS-meetodi tulemuslikkus

Proov	Keskmine leitud EK sisaldus (ng/ml)	Lisatud EK saagis (%)	Sr	SR	RSDr (%)	RSDR (%)
Veinid üle 14 mahuprotsendi	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
Veinid kuni 14 mahuprotsenti	11		0,43	2,03	3,94	18,87
	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86