31999R0761

L 99/4 *AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA* 1999.4.14.

A BIZOTTSÁG 761/1999/EK RENDELETE

(1999. április 12.)

a boranalízis közösségi módszereinek meghatározásáról szóló 2676/90/EGK rendelet módosításáról

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb az 1627/98/EK rendelettel ([1]) módosított, a borpiac közös szervezéséről szóló, 1987. március 16-i 822/87/EGK tanácsi rendeletre ([2]) és különösen annak 74. cikkére,

mivel a legutóbb a 822/97/EK rendelettel ([3]) módosított 2676/90/EGK bizottsági rendelet ([4]) melléklete analitikai módszereket tartalmaz; mivel a 20. fejezetben a D-almasav analízisére leírt módszer kissé pontatlannak bizonyult, és egy új, pontosabb módszert fejlesztettek ki; mivel új módszert fejlesztettek ki a ciánszármazékok analízisére, amely sokkal érzékenyebb és könnyebben alkalmazható; mivel a borban lévő etil-karbamát meghatározására új módszert fejlesztettek ki nemzetközi szinten; mivel ezt a három módszert nemzetközileg elismert kritériumok alapján tanúsították; mivel ezeknek a módszereknek az alkalmazása biztosíthatja a bor minőségének és eredetiségének jobb ellenőrzését, és megelőzheti az elavult és valamennyire megbízhatatlan analitikai módszerek alkalmazása miatti vitákat; mivel az új módszerek leírásait a Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Hivatal jóváhagyta; mivel ezeket bele kell foglalni az említett rendeletbe;

mivel az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak a Borpiaci Irányítóbizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

1. cikk

A 2676/90/EGK rendelet melléklete a következők szerint módosul:

1. A 20. fejezet (D-almasav) helyébe e rendelet I. melléklete lép;
2. A 38. fejezet (Ciánszármazékok) helyébe e rendelet II. melléklete lép;
3. A 44. fejezet kiegészül e rendelet III. mellékletével.

2. cikk

Ez a rendelet az *Európai Közösségek Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő hetedik napon lép hatályba.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 1999. április 12-én.

a Bizottság részéről

Franz FISCHLER

a Bizottság tagja

([1]) HL L 210., 1998.7.28., 10. o.
([2]) HL L 84., 1987.3.27., 1. o.
([3]) HL L 117., 1997.5.7., 10. o.
([4]) HL L 272., 1990.10.3., 1. o.

I. MELLÉKLET

„20. **D-ALMASAV**

(enzimatikus módszer)

1. ALAPELV

D-malát-dehidrogenáz (D-MDH) jelenlétében a D-almasavat (D-malát) a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) oxál-acetáttá oxidálja. A létrejött oxál-acetát piruváttá és szén-dioxiddá bomlik.

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

A keletkezett NADH mennyisége arányos a D-malát koncentrációjával, és 334, 340 vagy 365 nm-en mérjük.

2. REAGENSEK

Tesztkombináció kb. 30 meghatározáshoz.

a) 1. palack kb. 30 ml oldattal, amely HEPES pufferoldatból [N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-2-etán-szulfonsav] pH = 9,0 és stabilizátorokból áll;

b) 2. palack kb. 210 mg NAD-liofilizátummal;

c) 3. palackból három darab D-MDH-liofilizátummal, darabonként kb. 8 egység.

Az oldatok elkészítése

1. Az 1. palack tartalmát hígítatlanul használjuk. Felhasználás előtt állítsuk be az oldat hőmérsékletét 20–25 °C-ra.

2. Oldjuk fel a 2. palack tartalmát 4 ml kétszer desztillált vízben.

3. Oldjuk fel az egyik 3. palack tartalmát 0,6 ml kétszer desztillált vízben. Felhasználás előtt állítsuk be az oldat hőmérsékletét 20–25 °C-ra.

Az oldatok stabilitása

Az 1. számú palack tartalma legalább egy évig áll el, ha + 4 °C hőmérsékleten tároljuk; a 2. számú oldat három hónapig áll el, ha + 4 °C hőmérsékleten tároljuk, és két hónapig, ha – 20 °C hőmérsékleten tároljuk; a 3. számú oldat öt napig áll el, ha + 4 °C hőmérsékleten tároljuk.

3. ESZKÖZÖK

3.1. Spektrofotométer, amellyel 340 nm-en lehet méréseket végezni, amely hullámhosszon az NADH-abszorpció maximuma van. Amennyiben nincs ilyen készülék, nem folytonos spektrumú fotométer is használható, amellyel 334 vagy 365 nm-en lehet mérni. Mivel abszolút abszorbancia-mérések történnek (azaz nincs kalibrációs oldatsorozat, hanem az NADH abszorpciós együtthatójához való viszonyítás történik), a készülék hullámhosszpontosságát és az abszorpció linearitását ellenőrizni kell.

3.2. Üvegküvették 1 cm-es fényúttal (igény szerint eldobható küvették is használhatók).

3.3. Mikropipetták 0,01–2 mm térfogatok pipettázásához.

4. A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

A D-almasav meghatározását normál esetben közvetlenül a borból végzik, előzetes színtelenítés nélkül.

A küvettában lévő D-almasav mennyiségének 2–50 μg között kell lennie. A bort ezért úgy kell hígítani, hogy a D-almasav-koncentráció 0,02 és 0,5 g/l (mérés 365 nm-en) vagy 0,02 és 0,3 g/l (mérés 340, 334 nm-en) között legyen (az alkalmazott készüléktől függően).

Hígítási táblázat:

Becsült D-almasav/liter mennyiség		Hígítás vízzel	F hígítási tényező
Mérés hullámhossza:			
340 vagy 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. ELJÁRÁS

340 nm-es hullámhosszra beállított spektrofotométerrel határozzuk meg az abszorbanciát 1 cm-es küvetták használatával, a zéró abszorbancia beállításához levegőt (nincs küvetta a fényútban) vagy vizet használva.

Pipettázzunk a küvettákba:

	Referencia	Teszt
1. oldat	1,00 ml	1,00 ml
2. oldat	0,10 ml	0,10 ml
Kétszer desztillált víz	1,80 ml	1,70 ml
Minta a méréshez	–	0,10 ml

Keverjük össze, és kb. hat perc múlva mérjük meg a referencia- és a tesztoldat abszorpcióját (A_1).

Adjuk hozzá a következőt:

	Referencia	Teszt
3. oldat	0,05 ml	0,05 ml

Keverjük össze; várjuk meg, amíg a reakció befejeződik (kb. 20 perc), és mérjük meg a referenciaoldat és a tesztoldat abszorpcióit (A_2).

Számítsuk ki az abszorbancia-különbséget ($A_2 - A_1$) a referencia- (ΔA_T) és a teszt- (ΔA_E) oldatokra. Végezetül számoljuk ki e különbségek közötti különbséget: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Megjegyzés: Az enzimreakció befejeződéséhez szükséges idő tételről tételre változhat. *A fent megadott időtartam csak iránymutató jellegű, és ajánlatos azt meghatározni minden egyes tételhez.*

A D-almasav gyorsan reagál. Az enzim az L-borkősavat is átalakítja, bár sokkal lassabban. Ez magyarázza azt az enyhe mellékreakciót, amely extrapoláció segítségével korrigálható (lásd az A. függeléket).

6. EREDMÉNY

A koncentrációnak mg/l-ben történő kiszámítására szolgáló általános összefüggés az alábbi:

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

ahol:

V = a tesztoldat térfogata ml-ben (2,95 ml)

v = a minta térfogata ml-ben (0,1 ml)

PM = a meghatározandó anyag molekulatömege (D-almasavra PM = 134,09)

d = a küvetta fényútja cm-ben (1 cm)

ε = az NADH abszorpciós együtthatója:

340 nm-nél = 6,3 (1 mmol-1 cm-1)

365 nm-nél = 3,4 (1 mmol-1 cm-1)

334 nm-nél = 6,18 (1 mmol-1 cm-1)

Ha a mintát az előkészítés során hígítottuk, szorozzuk be az eredményt a hígítási tényezővel.

A D-almasav-koncentrációt mg/l-ben adjuk meg, tizedesek nélkül.

7. PONTOSSÁG

A módszer pontosságára vonatkozó, laboratóriumok közötti minták részleteit a B. függelék összegzi. Előfordulhat, hogy a laboratóriumok közti körvizsgálatból eredő értékek nem alkalmazhatók a B. függelékben lévő analitkoncentráció és mátrixok tartományain kívüli tartományokra.

7.1. **Ismételhetőség**

Egy ugyanazt a készüléket használó vizsgáló által a lehető legrövidebb időn belül végzendő vizsgálat mellett azonos anyagból nyert mintára megadott két önálló eredmény közötti abszolút különbség nem lépheti túl az r ismerhetőségi értéket az esetek több mint 5 %-ában.

r = 11 mg/l

7.2. **Reprodukálhatóság**

Két különböző laboratóriumban azonos anyagból nyert mintára megadott két önálló eredmény közötti abszolút különbség nem lépheti túl az R reprodukálhatósági értéket az esetek több mint 5 %-ában.

R = 20 mg/l

8. MEGJEGYZÉSEK

E módszer pontossági fokának szempontjából az 50 mg/l alatti D-almasav-értékeket szükség esetén más mérési alapelvet használó analitikai módszerrel kell igazolni, mint pl. a Przyborski *et al.* módszere (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215–218. 1993).

A küvettában lévő borminta nem lehet több mint 0,1 ml az enzimtevékenység esetleges polifenolok általi gátlásának megakadályozása érdekében.

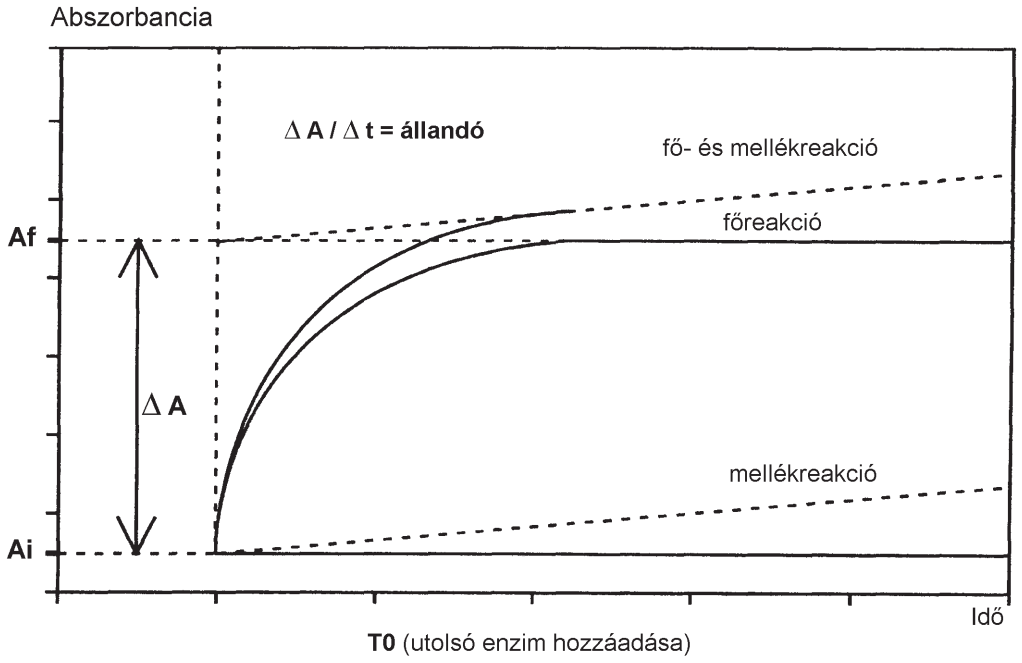
A. függelék

Hogyan kezeljük a mellékreakciókat

A mellékreakciókat általában az enzim másodlagos reakciói, a mintamátrixban lévő más enzimek jelenléte vagy egy vagy több mátrixelem kofaktorral való kölcsönhatása okozzák az enzimreakcióban.

Normál reakció esetén az abszorbancia bizonyos idő, általában 10-20 perc elteltével állandó értéket ér el a specifikus enzimreakció sebességétől függően. Ha azonban másodlagos reakciók fordulnak elő, az abszorbancia nem ér el állandó értéket, hanem idővel általában nő. Ezt a folyamatot általában „mellékreakciónak" hívjuk.

Ha mellékreakció fordul elő, az oldat abszorbanciáját rendszeres időintervallumokban kell mérni (minden második-ötödik percben), miután eltelt az az idő, amely ahhoz szükséges, hogy a standard oldat elérje végső abszorbanciáját. Ha az abszorbancia szabályosan nő, öt vagy hat mérést kell végezni, és vissza kell extrapolálni egy grafikon vagy számítás segítségével, hogy meghatározzuk azt az abszorbanciát, amelyet akkor figyelhettünk volna meg, amikor az utolsó enzimet hozzáadtuk (T0). A szubsztrátum-koncentrációt az erre az időre extrapolált abszorbancia különbsége alapján számítjuk (Af – Ai).



1. ábra: Mellékreakció

B. függelék

A laboratóriumok közötti körvizsgálat statisztikai eredményei

A laboratóriumok közötti körvizsgálat éve:	1995
Laboratóriumok száma:	8
Minták száma:	5, D-almasav hozzáadásával

Minta	A	B	C	D	E
A hibás eredményeket szolgáltató laboratóriumok kiesése után fennmaradt laboratóriumok száma	7	8	7	8	7
A kiesők (laboratóriumok) száma	1	–	1	–	1
Elfogadott eredmények száma	35	41	35	41	36
Átlagérték ($\bar{\chi}$)(mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Az ismételhetőség standard szórása (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Az ismételhetőség relatív szórása (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Ismételhetőségi határ (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
A reprodukálhatóság standard szórása (S_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
A reprodukálhatóság relatív szórása (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Reprodukálhatósági határérték (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Minták típusai:
A: vörösbor; B: vörösbor; C: fehérbor; D: fehérbor; E: fehérbor.”

II. MELLÉKLET

„38. **CIÁNSZÁRMAZÉKOK**

(*Figyelem*: tartsuk be a biztonsági intézkedéseket a klóramin-T, a piridin, a kálium-cianid, a sósav és a foszforsav használatakor. Az elhasznált termékeket helyezzük el a hatályos környezetvédelmi szabályoknak megfelelően. Legyünk óvatosak a savasított bor desztillációjakor felszabaduló hidrogén-cianiddal.)

1. ALAPELV

A borban lévő összes szabad hidrogén-cianidot savas hidrolízissel szabadítjuk fel, és desztillációval választjuk el. A klóramin-T-vel és piridinnel történő reakció után a kialakult glutakon-dialdehidet fotometriásan határozzuk meg az 1,3-dimetil-barbitursavval létrejövő kék elszíneződés alapján.

2. ESZKÖZÖK

2.1. **Desztillációs készülék**

Használjunk olyan desztillációs készüléket, amelyet a bor alkoholtartalmának meghatározásánál írtunk le

2.2. 500 ml-es gömblombik, normál csiszolattal

2.3. Termosztatikusan 20 °C-ra beállított vízfürdő

2.4. Spektrofotométer, amellyel 590 nm-es hullámhosszon lehet abszorbanciát mérni

2.5. Üvegküvették, vagy egyszer használatos küvették 20 mm-es fényúttal

3. REAGENSEK

3.1. 25 % (m/v) foszforsav (H_3PO_4)

3.2. 3 % (m/v) klóramin-T-oldat ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$)

3.3. 1,3-dimetil-barbitursav-oldat: oldjunk fel 3,658 g 1,3-dimetil-barbitursavat ($C_6H_8N_2O_3$) 15 ml piridinben és 3 ml sósavban (ρ_{20} = 1,19 g/ml), és adjunk hozzá 50 ml desztillált vizet.

3.4. Kálium-cianid (KCN)

3.5. 10 % (m/v) kálium-jodid (KI) -oldat

3.6. 0,1 M ezüst-nitrát-oldat ($AgNO_3$)

4. ELJÁRÁS

4.1. **Desztillálás**

500 ml-es lombikba (2.2.) tegyünk 25 ml bort, 50 ml desztillált vizet, 1 ml foszforsavat (3.1.) és néhány üveggyöngyöt. Illesszük össze a lombikot azonnal a desztillációs készülékkel. Elvékonyodó toldalékcsövet használva, a desztillátumot 50 ml-es, kalibrált lombikba vezetjük, amely már 10 ml vizet tartalmaz. Merítsük a kalibrált lombikot jeges vízbe. Gyűjtsünk össze 30–35 ml desztillátumot (vagy összesen kb. 45 ml folyadékot) a kalibrált lombikba.

Öblítsük át az elvékonyodó toldalékcsövet néhány milliliter desztillált vízzel, állítsuk be a desztillátum hőmérsékletét 20 °C-ra, és töltsük fel jelig desztillált vízzel.

4.2. **Mérés**

Tegyünk 25 ml desztillátumot egy 50 ml-es Erlenmeyer-lombikba, amely csiszolatos üvegdugóval van ellátva, adjunk hozzá 1 ml klóramin-T-oldatot (3.2.), és zárjuk le a dugóval légmentesen. Pontosan 60 másodperc múlva adjunk hozzá 3 ml 1,3-dimetil-barbitursav-oldatot (3.3.), zárjuk le légmentesen a dugóval, és hagyjuk 10 percig állni. Ezután mérjük meg az abszorbanciát a kontrollhoz viszonyítva (25 ml desztillált víz a 25 ml desztillátum helyett) 590 nm hullámhosszon, 20 mm-es fényúttal rendelkező küvettákban.

5. A KALIBRÁCIÓS GÖRBE FELVÉTELE

5.1. **A kálium-cianid argentometriás titrálása**

Oldjunk fel pontosan kimért 0,2 g KCN-ot (3.4.) 100 ml desztillált vízben egy 300 ml-es kalibrált lombikban. Adjunk hozzá 0,2 ml kálium-jodid-oldatot (3.5.), és titráljuk 0,1 M ezüst-nitrát-oldattal (3.6.), amíg stabil sárgás színt kapunk.

1 ml 0,1 M ezüst-nitrát-oldat megfelel 13,2 mg KCN-nak, amely alapján kiszámítható az oldat KCN-koncentrációja.

5.2. **Standard görbe**

5.2.1. *A standard oldatok előkészítése*

Az 5.1. szakaszban leírt eljárás szerint megállapított koncentrációjú KCN-ból készítsünk standard oldatot, amely 30 mg/l hidrogén-cianidot tartalmaz (30 mg HCN 72,3 mg KCN). Hígítsuk az oldatot tízszeresére.

Tegyünk 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml és 5,0 ml, a fentiek szerint hígított oldatot 100 ml-es kalibrált lombikokba, és töltsük fel jelig desztillált vízzel. Az így készített oldatok 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg és 150 µg hidrogén-cianidot tartalmaznak literenként.

5.2.2. *Titrálás*

Vegyünk 25 ml-t az így nyert oldatokból, és járjunk el a 4.1. és 4.2. szakaszban leírtaknak megfelelően.

A standard oldatok hidrogén-cianid-koncentrációinak függvényében kapott abszorbancia-értékek az origón áthaladó egyenest adnak.

6. EREDMÉNY

A hidrogén-cianid-koncentrációt µg/l-ben adjuk meg, tizedesek nélkül.

6.1. **Számítási mód**

Olvassuk le a hidrogén-cianid koncentrációt a kalibrációs görbén. Ha a mintát hígítottuk, szorozzuk meg az eredményt a hígítási tényezővel.

Ismételhetőség (r) és reprodukálhatóság (R)

Fehérbor = r = 3,1 µg/l vagy kb. 6% · xi

R = 12 µg/l vagy kb. 25% · xi

Vörösbor = r = 6,4 µg/l vagy kb. 8%

R = 23 µg/l vagy kb. 29% · xi

x_i = a HCN átlagos koncentrációja a borban

x_i = 48,4 µg/l fehérborra

x_i = 80,5 µg/l vörösborra”

III. MELLÉKLET

44. ETIL-KARBAMÁT MEGHATÁROZÁSA BORBAN: GÁZKROMATOGRÁFIÁS/TÖMEGSPEKTROMETRIÁS (GC/MS) MÓDSZERT ALKALMAZÓ SZELEKTÍV MEGHATÁROZÁS

(10–200 μg/l koncentrációjú etil-karbamát meghatározására alkalmas)

(*Figyelem*: tartsuk be a biztonsági intézkedéseket az etil-alkohol-, az aceton-, a karcinogén-termékek (etil-karbamát és diklór-metán) kezelésekor. Az elhasznált oldatokat helyezzük el a hatályos környezetvédelmi szabályoknak megfelelően.)

A. **Alapelv**

Belső standardként propil-karbamátot adunk a mintához, az oldatot vízzel hígítjuk, és 50 ml álló fázisú elválasztóoszlopra visszük. Az etil-karbamátot és a propil-karbamátot diklór-metánnal eluáljuk.

Az eluátumot vákuumlepárló vagy -koncentráló rendszerben töményítjük be. A koncentrátumot gázkromatográfiás módszerrel (GC) analizáljuk. A detektálást tömegspektrometriával SIM (szelektált ion-megfigyelés) üzemmódban végezzük.

B. **Eszközök és kromatográfiás körülmények (példa)**

a) Gázkromatográf/tömegspektrométer (GC/MS), és, ha szükséges, egy mintaadagoló és adatkezelő vagy azzal egyenértékű rendszer.

Kvarc kapillárisoszlop 30 m (*) x 0,25 mm belső átmérő, 0,25 μm-es Carbowax 20M

Működés: injektor 180 °C, héliumgáz-sebesség 1 ml/perc 25 °C hőmérsékleten, injektálás splitless módszerrel

Hőmérséklet-program: 40 °C 0,75 percig, ezután hőmérséklet-növelés 10 °C/perces gradienssel 60 °C-ig, majd 3 °C/perccel 150 °C-ig (**), emelés 220 °C-ra, és ezen a hőmérsékleten tartva 4,25 percig. Az etil-karbamát retenciós ideje 23–27 perc, propil-karbamát esetén 23–31 perc.

Gázkromatográf/tömegspektrométer (GC/MS) -interfész: 220 °C-os átvezető. A tömegspektrométer paramétereit manuálisan hangoljuk perfluor-tributil-aminnal, és optimalizáljuk egy alacsonyabb tömegérzékenységre, SIM technika, oldószer hatásideje és a felvétel kezdőidőpontja 22 perc, tartózkodási idő/ion 100 msec.

b) Forgó vákuumpárologtató vagy Kuderna Danish-hoz hasonló sűrítőrendszer.

(*Megjegyzés:* az etil-karbamát vizsgálati mintából való visszanyerési hatásfokának, C(g), 90 és 110 % között kell lennie a folyamat során.)

c) 300 ml-es, normálcsiszolatos gömblombik

d) töményítő cső – 4 ml-es, kalibrált, teflonbevonatú csatlakozóval és dugóval

C. **Reagensek**

a) Aceton – kromatográfiás minőség

(*Megjegyzés:* ellenőrizzünk minden tételt, mielőtt a GC/MS-ben használnánk, hogy elkerüljük a reakciót a 62, 74 és 89 m/z ionokra.)

b) Diklór-metán

(*Megjegyzés:* analizáljunk minden tételt, mielőtt a GC/MS-ben használnánk 200-szoros töményítés után, annak ellenőrzésére, hogy elkerüljük azt a reakciót a 62, 74 és 89 m/z ionokra.)

c) Etil-alkohol – vízmentes

(*) A különösen magas alkoholtartalmú borok számára 50 m-es kapillárisoszlop is szükséges lehet.
(**) Bizonyos magas alkoholtartalmú borok esetében 2 °C/perces hőmérsékleti programra lehet szükség.

d) Etil-karbamát (EC) standard oldatok

1. 1,00 mg/ml koncentrációjú törzsoldat. 100 ml-es mérőlombikba mérjünk be 100 mg EC-t (tisztaság 99 %), és töltsük fel jelig acetonnal.

2. 10,0 µg/ml koncentrációjú standard munkaoldat. Egy 100 ml-es mérőlombikba tegyünk 1 ml etil-karbamát-törzsoldatot, és töltsük fel jelig acetonnal.

e) Propil-karbamát (PC), standard oldatok

1. 1,00 mg/ml koncentrációjú törzsoldat. 100 ml-es mérőlombikba mérjünk be 100 mg PC-t (tisztaság 99 %), és töltsük fel jelig acetonnal.

2. 10,0 µg/ml koncentrációjú standard munkaoldat. 100 ml-es mérőlombikba tegyünk 1 ml propil-karbamát-törzsoldatot, és töltsük fel jelig acetonnal.

3. 400 ng/ml-es koncentrációjú belső standard oldat. 100 ml-es mérőlombikba tegyünk 4 ml probil-karbamát standard munkaoldatot, és töltsük fel vízzel jelig.

f) Standard kalibrált EC-PC oldatok

Hígítsunk EC standard munkaoldatot (d)(2) és PC standard munkaoldatot (e)(2) diklór-metánnal, hogy az alábbi oldatokat kapjuk:

1. (100 ng EC és 400 ng PC)/ml;
2. (200 ng EC és 400 ng PC/ml;
3. (400 ng EC és 400 ng PC)/ml;
4. (800 ng EC és 400 ng PC)/ml;
5. (1 600 ng EC és 400 ng PC)/ml.

g) Ellenőrző minta – 100 ng EC/ml 40 % etil-alkoholban

100 ml-es mérőlombikba tegyünk 1 ml EC standard munkaoldatot (d)(2), és töltsük jelig 40 % etil-alkohollal.

h) Szilárd halmazállapotú extrakciós oszlop – kovafölddel töltött, 50 ml-es kapacitású, egyszer használatos

Megjegyzés: Analízis előtt ellenőrizzük az extrakciós oszlopok minden tételét az EC és PC kinyerésére és a 62, 74 és 89 m/z ionreakciók hiányára. Készítsünk 100 ng EC/ml ellenőrző mintát (g). Analizáljunk 5,00 ml ellenőrző mintát a D(a), E és F részben leírtak szerint. 90-110 ng EC/ml-es kinyerése elfogadható. A szabálytalan szemcseátmérőjű abszorbensek lassú áramláshoz vezethetnek, ami befolyásolja az EC és PC kinyerését. Ha ismételt vizsgálat után sem kapunk 90–110 %-os kinyerési hatásfokot, cseréljük ki az oszlopot, vagy használjunk a kinyerési hatásfokkal korrigált kalibrációs görbét az EC mennyiségi meghatározásához. A korrigált kalibrációs görbe felvételéhez készítsünk standard oldatokat az f)-ben leírtaknak megfelelően, 40 %-os etil-alkoholt használva a diklór-metán helyett.

Analizáljunk 1 ml standard kalibrációs oldatot a D, E és F szakaszban leírtak szerint.

Hozzunk létre egy új kalibrációs görbét az extrahált standardok EC/PC arányának használatával.

D. **A vizsgálati minta előkészítése**

Tegyük a következő térfogatú vizsgálandó mintákat két önálló 100 ml-es főzőpohárba:

a) 14 % (V/V) alkoholnál magasabb alkoholtartalmú borok: 5,00 ± 0,01 ml;

b) legfeljebb 14 % (V/V) alkoholtartalmú borok: 20,00 ± 0,01 ml.

Mindegyik főzőpohárhoz adjunk 1 ml belső standard PC-oldatot C(e)(3) és vizet, hogy összesen 40 ml térfogatot kapjunk (vagy 40 g-ot).

E. **Extrahálás**

Az extrahálást elszívófülkében végezzük, megfelelő levegőztetéssel.

Vigyük fel a D. rész szerint előkészített mintát az extrahálóoszlopra.

Öblítsük ki a főzőpoharat 10 ml vízzel, és töltsük az öblítővizet is az oszlopra.

Hagyjuk a folyadékot abszorbeálódni négy percig, majd eluáljuk 2 x 80 ml diklór-metánnal. Gyűjtsük össze az eluátumot egy 300 ml-es Erlenmeyer-lombikba.

Töményítsük az eluátumot 2-3 ml-re vízfürdőben forgó párologtató segítségével 30 °C hőmérsékleten. (*Megjegyzés*: ne engedjük szárazra párolódni.)

Tegyük át a töményített maradékot egy 4 ml-es kalibrált csőbe Pasteur-pipettával.

Öblítsük át a lombikot 1 ml diklór-metánnal, és az öblítőfolyadékot vigyük át a csőbe. Töményítsük a mintát 1 ml-re gyenge nitrogénáram alatt.

Szükség esetén tegyük a koncentrátumot a mintaadagolóba GC/MS-vizsgálat céljából.

F. **GC/MS-vizsgálat**

a) Kalibrációs görbe

Injektáljunk minden standard kalibrációs oldatból C. f) 1 µl-t a GC/MS-be. Vegyük fel a kalibrációs görbét. A függőleges tengelyen a 62 m/z ionreakció EC-PC területi arányát, a vízszintes tengelyen az EC-mennyiséget ng/ml-ben (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml) adjuk meg.

b) EC mennyiségi meghatározása

Injektáljunk 1 µl-t az E. szerint előkészített töményített extraktumból a GC/MS-rendszerbe, és számítsuk ki az EC-PC-területi arányt a 62 m/z ionra. Határozzuk meg az EC-koncentrációt (ng/ml) az extraktumban a belső standard kalibrációs görbéjének használatával. Számítsuk ki az EC-koncentrációt a vizsgálati mintában (ng/ml) úgy, hogy elosztjuk az extraktumban lévő EC (ng) mennyiségét a vizsgálati minta térfogatával (ml).

c) Az EC-azonosság igazolása

Határozzuk meg, hogy a 62, 74 és 89 m/z ionok reakciói megjelennek-e az EC retenciója során. Ezek a reakciók a $(M - C_2H_2)^+$ és $(M - CH_3)^+$ fő fragmentumok, valamint az $(M)^+$ molekuláris ion jellemzői. Az EC jelenléte akkor igazolt, ha ezeknek az ionoknak a relatív arányai az EC standard arányainak 20 %-án belül vannak. Szükségessé válhat az extraktum esetleges további töményítése abból a célból, hogy megfelelő reakciót kapjunk a 89 m/z ionra.

G. **Laboratóriumok közötti körvizsgálat**

Az alábbi táblázat a gyakorlati minta önálló eredményeit mutatja mindkét bortípusra.

A Cochran-vizsgálat csak egy eredménypár kizárásához vezetett mind a 14 % (V/V) alkoholtartalomnál magasabb, mind a 14 % (V/V), vagy annál kisebb alkoholtartalmú borok esetében, amelyek két különböző laboratóriumból származnak.

A relatív reprodukálhatóság (RSD_R) csökkenő trendet mutat az etil-karbamát koncentrációjának növekedésével.

Alkoholos italokban lévő etil-karbamát GC/MS-módszerrel történő meghatározásának teljesítménye

Minta	Átlagosan talált EC-tartalom (ng/ml)	EC kinyerési hatásfoka (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Borok > 14 % (V/V)	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
Borok ≤ 14 % (V/V)	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