

II

(Közlemények)

AZ EURÓPAI UNIÓ INTÉZMÉNYEITŐL, SZERVEITŐL, HIVATALAITÓL ÉS
ÜGYNÖKSÉGEITŐL SZÁRMAZÓ KÖZLEMÉNYEK

EURÓPAI BIZOTTSÁG

Az 1234/2007/EK tanácsi rendelet ⁽¹⁾ 120g. cikkének első bekezdésében említett analitikai módszerek jegyzéke és leírása

(a 2009. július 10-i 606/2009/EK bizottsági rendelet ⁽²⁾ 15. cikke (2) bekezdésének megfelelően közzétéve)

(2010/C 43/01)

Az alábbi táblázat a közösségi szabályozás által a borászati termékek előállítása tekintetében megállapított határértékek és követelmények ellenőrzése céljából alkalmazandó analitikai módszerek jegyzékét és leírását foglalja egybe. A harmadik oszlopban minden egyes paraméter kapcsán megtalálható a Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Szervezet (OIV) által közzétett, «Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts» (A borok és mustok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve) című kiadvány jelenleg elérhető legutolsó kiadásában (2009) leírt, az adott paraméterre vonatkozó analitikai módszer hivatkozási száma. A paraméterek kapcsán csak az (OIV besorolása szerinti „I. típus” vagy „II. típus”) alá tartozó referenciamódszerek kerültek leírásra, kivéve azon paraméterek esetében, melyek kapcsán jelenleg nem áll rendelkezésre érvényesített I. típusú vagy II. típusú módszer. A módszerek leírását a közlemény melléklete tartalmazza.

Emlékeztető:

Az OIV kézikönyve A. mellékletének I. szakasza tartalmazza az analitikai módszerek különböző típusainak leírását, így az I. típus (kritérium referencia-módszer), a II. típus (referencia-módszer) és a IV. típus (átmeneti módszer) leírását.

Az ólomra és a kadmiumra vonatkozó analitikai módszereket a 2007. március 28-i 333/2007/EK bizottsági rendelet ⁽³⁾ (C-3. melléklet) írja le. Továbbá a 2006. február 23-i 401/2006/EK rendelet ⁽⁴⁾ II.4 mellékletében megállapítja az ochratoxin-A-ra vonatkozó analitikai módszerek általános feltételeit, így ezen anyag tekintetében nem szükséges a borászati termékekre jellemző módszer leírása.

AZ ANALITIKAI MÓDSZEREK JEGYZÉKE

Nº	Paraméter	Az OIV kézikönyve szerinti módszer	Típus
1	Sűrűség/fajlagos sűrűség	AS-2-01-MASVOL	I
2	Refrakciós mutató	AS-2-02-SUCREF	I
3	Összes szárazextrakt-tartalom	AS-2-03-EXTSEC	I
4	A borban lévő víztartalom ¹⁸ O/ ¹⁶ O izotóp-aránya	AS-2-09-MOUO18	II

⁽¹⁾ HL L 299., 2007.11.16.

⁽²⁾ HL L 193., 2009.07.24., 1. o.

⁽³⁾ HL L 88., 2007.3.29., 29. o.

⁽⁴⁾ HL L 70., 2006.3.9., 12. o.

Nº	Paraméter	Az OIV kézikönyve szerinti módszer	Típus
5	Folin-index	AS-2-10-INDFOL	IV
6	Cukortartalom (= glükóz+fruktóz)	AS-311-02-GLUFRU	II
7	Szacharóztartalom (HPLC-mérés)	AS-311-03-SUCRES	II
8	Deutérium mágneses magrezonanciás mérése a boralkoholban	AS-311-05-ENRRMN <i>(felülvizsgálat alatt)</i>	I
9	Térfogatszázalékban meghatározott alkohol-tartalom	AS-312-01-TALVOL	I
10	¹³ C/ ¹² C izotópok aránya a boralkoholban	AS-312-06-ETHANO	II
11	Összes sav	AS-313-01-ACITOT	I
12	Illósavtartalom	AS-313-02-ACIVOL	I
13	Citromsav	AS-313-09-ACIENZ	II
14	Szorbinsav	AS-313-14-ACISOR	IV
15	Must pH-értéke	AS-313-15-PH	I
16	Aszkorbinsav	AS- 313-22 ACASCO	II
17	CO ₂ g/l	AS-314-01-DIOCAR	II
18	CO ₂ g/l (nyomásmérés)	AS-314-04-CO2MAN	II
19	Szén-dioxid-túlnyomás	AS-314-02-SURPRES	I
20	Lizozim	AS-315-14-LYSOZY	IV
21	Kálium-szulfát	AS-321-05-SULFAT	II
22	Vas	AS-322-05-FER	IV
23	Réz	AS-322-06-CUIVRE	IV
24	Szulfid (SO ₂) vagy kén-dioxid összes mennyisége	AS-323-04-DIOSU	II

Egyes analitikai módszerek leírását az OIV hatóságai felülvizsgálják. Ezek a leírások egy későbbi bizottsági közleményben kerülnek közzétételre azt követően, hogy az OIV a felülvizsgált szöveget közzéteszi „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványa 2010-es kiadásában.

MELLÉKLET

TARTALOMJEGYZÉK

1. SÚRÚSÉG ÉS FAJLAGOS SÚRÚSÉG 20 °C HŐMÉRSÉKLETEN (OIV AS201- MASVOL) – I. típusú módszer	4
2. A SZŐLŐMUST, SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY ÉS FINOMÍTOTT SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY CUKORTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA REFRAKTOMETRIÁS MÓDSZERREL (OIV AS202- SUCREF) – I. típusú módszer	8
3. ÖSSZES SZÁRAZEXTRAKT-TARTALOM (OIV-AS-2-03-EXTSEC) Összes szárazanyag-tartalom – I. típusú módszer	10
4. A BORBAN LÉVŐ VÍZTARTALOM ¹⁸ O/ ¹⁶ O IZOTÓPARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA (OIV-AS-2-09-MOUO18) – II. típusú módszer	11
5. FOLIN-CIOCALTEU INDEX (OIV-AS-2-10-INDFOL) – IV. típusú módszer	12
6. GLÚKÓZ ÉS FRUKTÓZ (OIV-AS-311-02-GLUFU) – II. típusú módszer	14
7. CUKOR MEGHATÁROZÁSA NAGYTELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC) (SZACHARÓZ) (OIV-AS-311-03-SUCRES) – II. típusú módszer	17
8. A MUST, SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY, FINOMÍTOTT SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY ÉS BOR FELJAVÍTÁSÁNAK KIMUTATÁSA A DEUTÉRIUM MÁGNESES MAGREZONANCIÁS MÉRÉSÉVEL (SNIF-NMR/RMN-FINS) (OIV-AS-311-05-ENRRMN) – I. típusú módszer	18
9. TÉRFOGATSZÁZALÉKBAN MEGHATÁROZOTT ALKOHOLTARTALOM (OIV-AS-312-01-TALVOL) – I. típusú módszer	19
10. SZŐLŐMUST, SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY VAGY FINOMÍTOTT SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY FERMENTÁLÁSÁVAL ELŐÁLLÍTOTT BORALKOHOL VAGY ETANOL ¹³ C/ ¹² C IZOTÓPARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA IZOTÓPOS TÖMEGSPEKTROMETRIÁVAL (OIV-AS-312-06-ETHANO) – II. típusú módszer	20
11. ÖSSZES SAV (OIV-AS-313-01-ACITOT) – I. típusú módszer	27
12. ILLÓSAVTARTALOM (OIV-AS-313-02-ACIVOL) – I. típusú módszer	30
13. CITROMSAV (OIV -AS-313-09-ACIENZ) – II. típusú módszer	33
14. SZORBINSAV (OIV-AS-313-14-ACISOR) – IV. típusú módszer	36
15. pH (OIV-AS-313-15-PH) – I. típusú módszer	39
16. L- ASZKORBINSAV ÉS D-IZO-ASZKORBINSAV EGYIDŐBEN TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA HPLC-ELJÁRÁSSAL ÉS UV-DETEKTÁLÁSSAL (OIV-AS-313-22-ACASCO) – II. típusú módszer	41
17. SZÉN-DIOXID (OIV-AS-314-01-DIOCAR) – II. típusú módszer	45
18. A BORBAN JELENLÉVŐ SZÉN-DIOXID MANOMETRIKUS MÓDSZERREL TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA (OIV-AS314-04-CO2MAN) – II. típusú módszer	47
19. A GYÖNGYÖZŐBOROKBAN ÉS PEZSGŐKBEN KELETKEZŐ TÚLNYOMÁS MÉRÉSE (OIV-AS-314-02-SURPRES) – I. típusú módszer	48
20. A BORBAN JELEN LÉVŐ LIZOZIM MEGHATÁROZÁSA HPLC-ELJÁRÁSSAL (OIV-AS-315-14) – IV. típusú módszer	51
21. SZULFÁT (OIV- AS-321-05-SULFAT) – II. típusú módszer	54
22. VAS (OIV - AS-322-05-FER) – IV. típusú módszer	55
23. RÉZ (OIV - AS-322-06) – IV. típusú módszer	56
24. KÉN-DIOXID (OIV - AS-323-04-DIOSU) – II. típusú módszer	58

1 SŰRŰSÉG ÉS FAJLAGOS SŰRŰSÉG 20 °C HŐMÉRSÉKLETEN (OIV - AS2 - 01- MASVOL) – I. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. MEGHATÁROZÁSOK

A sűrűség a bor vagy a must térfogategységére eső tömege, 20 °C hőmérsékleten, g/ml egységben fejezzük ki, és jele $\rho_{20\text{ °C}}$.

A fajlagos sűrűség 20 °C-on a meghatározott térfogatú bor vagy must 20 °C-on mért sűrűségének (vagy a 20 °C/20 °C fajlagos sűrűség) és a víz ugyanazon hőmérsékleten mért sűrűségének hányadosa. Jelölése a $d_{20\text{ °C}}^{20\text{ °C}}$

2. A MÓDSZEREK ELVE

A sűrűség és a fajlagos sűrűség 20 °C hőmérsékleten az alábbiak szerint határozható meg:

meghatározás piknométerrel: referencia-módszer,

meghatározás sűrűségméréssel hidrosztatikai mérleg használatával vagy elektromos sűrűségmérővel.

Megjegyzés:

Nagyon pontos mérés céljából a sűrűséget korrigálni kell a kén-dioxid-tartalom miatt a következők alapján:

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

$$\rho_{20\text{ °C}} = \text{korrigált sűrűség}$$

$$\rho'_{20\text{ °C}} = \text{megállapított sűrűség}$$

$$S = \text{összes kén-dioxid mennyisége g/l-ben.}$$

3. A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

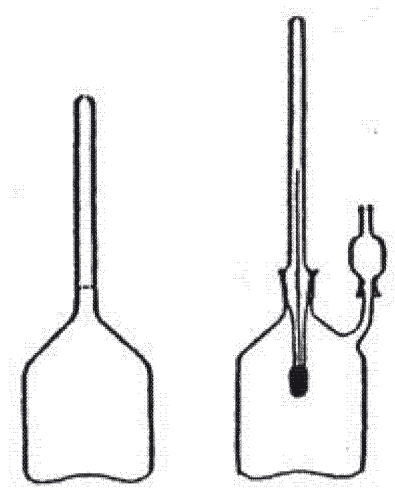
Amennyiben a bor vagy a must jelentős mennyiségű szén-dioxidot tartalmaz, ennek nagy részét távolítsuk el úgy, hogy 250 ml bort egy 1 literes palackban kevergetünk, vagy csökkentett nyomáson a szűrőben elhelyezett mintegy 2 g vattán átszűrjük.

4. REFERENCIA-MÓDSZER

4.1. Eszközök

Szokásos laboratóriumi eszközök, és különösen a következők:

- 4.1.1. 100 ml térfogatú pyrexüvegből készült piknométer⁽¹⁾, eltávolítható, normál csiszolatos hőmérővel, 10–30 °C-ig 0,1 °C-os osztásközzel. A hőmérőnek hitelesítettnek kell lennie (1. ábra).



1. ábra

A piknométer és táraedénye

A piknométernek 25 mm hosszú, legfeljebb 1 mm belső átmérőjű oldalága van, amely kónuszos csiszolatos csatlakozásban végződik. Ezt az oldalágot kónuszos, csiszolt üveg csatlakozócsőből álló olyan „edényzáróval” lehet lezárni, amely egy kivezető szakaszban végződik. Ez az elzáró tágulási kamraként szolgál.

⁽¹⁾ Bármilyen ezzel megegyező jellemzőjű piknométer használható.

A piknométer mindkét csiszolatát nagyon gondosan kell elkészíteni.

- 4.1.2. Táraként a leírt piknométerhez hasonló, ugyanolyan külső térfogatú (legfeljebb 1 ml-es tőrésel) és ugyanolyan tömegű edényt kell alkalmazni, mint a piknométer, 1,01 fajlagos sűrűségű folyadékkal (nátrium-klorid 2,0 m/V %-os oldata) megtöltve.

Hőszigetelő edény, amely pontosan illeszkedik a piknométerre.

- 4.1.3. Legalább 300 g terhelhetőségű és 0,1 mg érzékenyséű kétkarú mérleg,

vagy

legalább 200 g terhelhetőségű és 0,1 mg érzékenyséű egykarú mérleg.

4.2. A piknométer kalibrálása

A piknométer kalibrálása magában foglalja az alábbi mennyiségek meghatározását:

- az üres piknométer táratömege,
- a piknométer térfogata 20 °C hőmérsékleten,
- a vízzel megtöltött piknométer tömege 20 °C hőmérsékleten.

4.2.1. Módszer kétkarú mérleg használatával

Helyezzük a táraedényt a mérleg bal oldali, a tiszta, száraz piknométert és edényzáróját pedig a jobb oldali serpenyőbe. Egyensúlyozzuk ki a két tömeget úgy, hogy a piknométer mellé p gramm súlyt helyezünk.

Környezeti hőmérsékleten gondosan töltjük fel a piknométert desztillált vízzel, és helyezzük bele a hőmérőt; gondosan töröljük szárazra a piknométert, és helyezzük a hőszigetelő edénybe. Fel- és visszafordítással mozgassuk a piknométert mindaddig, amíg a hőmérséklet már nem változik. A piknométer oldalágában állítsuk be a folyadékszintet e jelhez. Töröljük szárazra az oldalágot, és helyezzük fel a dugót; olvassuk le gondosan a t °C hőmérsékletet, és ha szükséges, vegyük figyelembe a hőmérsékletskála pontatlanságát. Mérjük meg a vízzel telt piknométert, p' gramm súllyal visszaállítva a mérleg egyensúlyi helyzetét.

Számítás

Az üres piknométer táratömege:

az üres piknométer táratömege = $p + m$,

ahol m = a piknométerben lévő levegő tömege,

$m = 0,0012 (p - p')$.

Térfogat 20 °C hőmérsékleten:

$V_{20\text{ °C}} = (p + m - p') \times F_t$,

ahol F_t = az I. táblázatból vett, t °C -hoz tartozó hőmérsékleti tényező.

$V_{20\text{ °C}}$ értéket $\pm 0,001$ ml pontossággal ismerni kell.

A víz tömege 20 °C hőmérsékleten:

$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$

0,998203 = ahol a 0,998203 a víz sűrűsége 20 °C hőmérsékleten.

4.2.2. Módszer egykarú mérleg használatával

Határozzuk meg:

- a tiszta és száraz piknométer tömegét: ez legyen P ,
- a t °C hőmérsékleten vízzel töltött piknométer tömegét a 4.2.1. pont alatt leírt eljárással: ez legyen P_1 ,
- a táraedény tömegét: T_0

Számítás

Az üres piknométer táratömege:

az üres piknométer táratömege = $P - m$,

ahol m = a piknométerben található levegő tömege,

$$m = 0,0012 (P_1 - P)$$

Térfogat 20 °C hőmérsékleten:

$$V_{20\text{ °C}} = [P_1 - (P - m)] \times F_t$$

ahol F_t = az I. táblázatból vett, t °C-hoz tartozó hőmérsékleti tényező.

A térfogatot 20 °C hőmérsékleten $\pm 0,001$ ml pontossággal ismernünk kell.

A víz tömege 20 °C hőmérsékleten:

$$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$$

0,998203 = a víz sűrűsége 20 °C hőmérsékleten.

4.3. Mérési módszer**4.3.1. Módszer kétkarú mérleg használatával**

Mérjük meg a előkészített mintával (3. pont) feltöltött piknométert a 4.2.1. pontban alatt leírtak szerint.

Legyen p'' az a g -ban kifejezett tömeg, amely az egyensúly létrehozásához szükséges t °C hőmérsékleten.

A piknométerben lévő folyadék tömege = $p + m - p''$.

Látszólagos sűrűség t °C hőmérsékleten:

$$\rho_t\text{ °C} = (p + m - p'') / (V_{20\text{ °C}})$$

Számítsuk ki a sűrűséget 20 °C hőmérsékleten a későbbiekben megadott valamelyik korrekciós táblázat segítségével a mért folyadék természetének megfelelően: száraz bor (II. táblázat), természetes vagy sűrített must (III. táblázat), édes bor (IV. táblázat).

A bor 20 °C/20 °C fajlagos sűrűségét úgy számítjuk, hogy elosztjuk a bor 20 °C hőmérsékleten mért sűrűségét 0,998203-mal.

4.3.2. Módszer egykarú mérleg használatával

Mérjük meg a táraedényt, ennek tömege legyen T_1 .

Számítsuk ki a $dT = T_1 - T_0$ értéket.

Az üres piknométer tömege a mérés időpontjában = $P - m + dT$.

Mérjük meg a előkészített mintával (3. pont) feltöltött piknométert a 4.2.1. pontban alatt leírtak szerint. Legyen ennek tömege t °C hőmérsékleten P_2 .

A piknométerben lévő folyadék tömege t °C hőmérsékleten = $P_2 - (P - m + dT)$.

Látszólagos sűrűség t °C hőmérsékleten:

$$\rho_t\text{ °C} = (P_2 - (P - m + dT)) / (V_{20\text{ °C}})$$

Számítsuk ki a vizsgált folyadék sűrűségét 20 °C hőmérsékleten: száraz bor, természetes vagy sűrített must vagy édes bor a 4.3.1. pontnak megfelelően.

A 20 °C/20 °C fajlagos sűrűségét úgy számítjuk ki, hogy elosztjuk a 20 °C hőmérsékleten mért bor sűrűségét 0,998203-mal.

4.3.3. A sűrűség mérések ismételtetősége

száraz és féledes borokra: $r = 0,00010$

édes borokra: $r = 0,00018$

4.3.4. A sűrűség mérések reprodukálhatósága:

száraz és féledes borokra: $R = 0,00037$

édes borokra: $R = 0,00045$

I. TÁBLÁZAT

F tényezők,

amelyekkel a pyrexüvegből készült piknométerben lévő t °C hőmérsékletű víz tömege megszorozandó a piknométer térfogatának kiszámításához 20 °C hőmérsékleten

[Lásd az OIV által közzétett, „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványban leírt AS2 – 01 módszer II. mellékletének I. táblázatát]

II. TÁBLÁZAT

c hőmérséklet-korrekciók pyrexüvegből készült piknométerrel t °C hőmérsékleten mért száraz borok és alkoholmentes borok sűrűségének 20 °C-ra történő átszámítására

[Lásd az OIV által közzétett, Borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve című kiadványban leírt AS2 – 01 módszer II. mellékletének II. táblázatát]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (\rho)/(1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ ha } t \text{ } ^\circ\text{C} \text{ alacsonyabb } 20 \text{ } ^\circ\text{C-nál} \\ + \text{ ha } t \text{ } ^\circ\text{C} \text{ magasabb } 20 \text{ } ^\circ\text{C-nál} \end{array}$$

III. TÁBLÁZAT

c hőmérséklet-korrekciók pyrexüvegből készült piknométerrel t °C hőmérsékleten mért természetes mustok és sűrített mustok sűrűségének 20 °C-ra történő átszámítására

[Lásd az OIV által közzétett, Borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve című kiadványban leírt AS2 – 01 módszer II. mellékletének III. táblázatát]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (\rho)/(1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ ha } t \text{ } ^\circ\text{C} \text{ alacsonyabb } 20 \text{ } ^\circ\text{C-nál} \\ + \text{ ha } t \text{ } ^\circ\text{C} \text{ magasabb } 20 \text{ } ^\circ\text{C-nál} \end{array}$$

IV. TÁBLÁZAT

c hőmérséklet-korrekciók 13 térfogatszázalékos és annál magasabb alkoholtartalmú, maradékcukrot tartalmazó borok pyrexüveg piknométerrel t °C hőmérsékleten mért sűrűsége eredményeinek 20 °C hőmérséklethez való viszonyításához

[Lásd az OIV által közzétett, „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványban leírt AS2 – 01 módszer II. mellékletének IV. táblázatát]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (\rho)/(1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ ha } t \text{ } ^\circ\text{C} \text{ alacsonyabb } 20 \text{ } ^\circ\text{C-nál} \\ + \text{ ha } t \text{ } ^\circ\text{C} \text{ magasabb } 20 \text{ } ^\circ\text{C-nál} \end{array}$$

2 A SZŐLŐMUST, SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY ÉS FINOMÍTOTT SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY CUKORTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA REFRAKTOMETRIÁS MÓDSZERREL (OIV AS202- SUCREF) – I. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZER ELVE

A 20 °C-on meghatározott refrakcióértéket törésmutatóként vagy szacharóz-tartalom tömegszázalékában kifejezve adjuk meg, melynek alapján a szőlőmustokra, a szőlőmustersűrítvényekre és a finomított szőlőmustersűrítvényre vonatkozó megfelelő táblázatok segítségével megkaphatjuk a g/l-ben és g/kg-ban kifejezett invertcukortartalmat.

2. ESZKÖZÖK

2.1. **Abbé refraktométer**

Az alkalmazott refraktométert olyan skálával kell ellátni, amely:

- vagy az m/m % szacharózt mutatja 0,1 % (m/m)-os pontossággal,
- vagy a törésmutató értékét mutatja négy tizedes pontossáig.

A refraktométert el kell látni olyan hőmérővel, amelynek mérési tartománya legalább + 15 °C és + 25 °C között van, valamint olyan vízkeringető szivattyúval, amely lehetővé teszi, hogy a méréseket 20 °C ± 5 °C hőmérsékleten lehessen elvégezni.

A műszer használati utasítását pontosan be kell tartani, különösen a kalibrálás és a fényforrás vonatkozásában.

3. A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

3.1. **Szőlőmust és szőlőmustersűrítvény**

Szükség esetén szűrjük át a szőlőmustot négyrétre hajtott száraz gézen, a szűrlet első néhány cseppjét fel nem használva végezzük a meghatározást a szűrt mintán.

3.2. **Finomított szőlőmustersűrítvény**

A finomított mustersűrítvényt koncentrációtól függően közvetlenül vagy hígítva (200 g finomított mustersűrítvény desztillált vízzel 500 g-ra kiegészítve) használjuk a meghatározáshoz.

4. ELJÁRÁS

Állítsuk be a minta hőmérsékletét 20 °C közelire. Tegyük a mintából kis mennyiséget a refraktométer alsó prizmájára úgy, hogy a minta a két prizma összenyomása után egyenletesen oszadjon el a felületen. A mérést az alkalmazott műszer használati utasításának megfelelően végezzük el.

Olvassuk le a szacharóz-tömegszázalékot 0,1 % (m/m) pontossággal vagy a törésmutató értékét négy tizedes pontossággal.

Ugyanazzal az előkészített mintával végezzünk legalább két meghatározást. Jegyezzük fel a t °C hőmérsékletet.

5. SZÁMÍTÁSOK

5.1. **Hőmérséklet-korrekción**

5.1.1. Szacharóz tömegszázalékára kalibrált műszerek esetében: használjuk az I. táblázatot a hőmérséklet korrekciójához.

5.1.2. Törésmutatóra kalibrált műszerek értéke esetében: a II. táblázatban keressük meg a t °C hőmérsékleten mért törésmutatót, hogy megkapjuk (első oszlop) a megfelelő szacharóz-tömegszázalék értéket t °C-on. Ezt az értéket az I. táblázat segítségével 20 °C-ra korrigáljuk.

5.2. **Szőlőmust és szőlőmustersűrítvény invertcukor-tartalma**

Keressük meg a 20 °C-on kapott szacharóz-tömegszázalékértéket a II. táblázatban, és olvassuk le az ugyanabban a sorban egy tizedes pontossággal megadott invertcukor-koncentrációt g/l-ben és g/kg-ban.

5.3. **Finomított szőlőmustersűrítvény invertcukor-tartalma**

Keressük meg a 20 °C-on kapott szacharóz-tömegszázalékértéket a III. táblázatban, és olvassuk le az ugyanabban a sorban egy tizedes pontossággal megadott invertcukor-koncentrációt g/l-ben és g/kg-ban.

Ha a mérést hígított finomított szőlőmustersűrítménnyel végeztük, szorozzuk meg az eredményt a hígítási tényezővel.

5.4. **Szőlőmust, szőlőmustersűrítvény és finomított szőlőmustersűrítvény törésmutatója**

Keressük meg a 20 °C-on kapott szacharóz-tömegszázalékértéket a II. táblázatban, és olvassuk le ugyanabban a sorban a négy tizedes pontossággal kifejezett, 20 °C-os törésmutató értékét.

Megjegyzés: A must, a mustersűrítvény és a finomított must potenciális alkoholtartalma a 2000. július 25-i 1623/2000/EK bizottsági rendelet (HL L 194., 2000.7.31.) I. mellékletében található megfelelési táblázat alapján határozható meg.

I. TÁBLÁZAT

Elvégzendő korrekció, ha a szacharózkoncentráció meghatározása nem 20 °C hőmérsékleten történt

[Lásd az OIV által közzétett, „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványban leírt AS2 – 02 módszer mellékletének I. táblázatát]

II. TÁBLÁZAT

A szőlőmust és szőlőmustsűrítmény g/l-ben és g/kg-ban megadott cukortartalom 20 °C-on refraktométerrel meghatározva vagy szacharóz-tömegszázalék-(m/m %) vagy a törésmutató-érték alapján. A 20 °C-on mért sűrűség szintén meg van adva.

[Lásd az OIV által közzétett, „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványban leírt AS2 – 02 módszer mellékletének II. táblázatát]

III. TÁBLÁZAT

A finomított szőlőmustsűrítmény g/l-ben és g/kg-ban megadott cukortartalom 20 °C-on refraktométerrel meghatározva vagy szacharóz-tömegszázalék-(m/m %) vagy a törésmutató-érték alapján. A 20 °C-on mért sűrűség szintén meg van adva.

[Lásd az OIV által közzétett, „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványban leírt AS2 – 02 módszer mellékletének III. táblázatát]

3 ÖSSZES SZÁRAZEXTRAKT-TARTALOM (OIV-AS-2-03-EXTSEC) ÖSSZES SZÁRAZANYAG-TARTALOM – I. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. MEGHATÁROZÁS

Az összes szárazextrakt-, vagy az összes szárazanyag-tartalom minden olyan anyagot magában foglal, amely meghatározott környezeti körülmények között nem párolog el. Ezeknek a fizikai körülményeknek olyanoknak kell lenniük, hogy a vizsgálat során az extraktösszetevők a lehető legkisebb változáson menjenek át.

A cukormentesextrakt-tartalom az összes szárazextrakt- és az összes cukortartalom különbsége.

A redukált extrakt az összes szárazextrakt és az 1 g/l-t meghaladó összes cukor, az 1 g/l-t meghaladó kálium-szulfát, az esetleg jelenlévő mannit, és bármilyen, a borhoz hozzáadott egyéb vegyi anyag különbsége.

A maradvány extrakt a cukormentes extrakt valamint a borkósavban kifejezett kötött savtartalom különbsége.

A extraktot g/l-ben fejezzük ki, és 0,5 g-os pontossággal kell megadni.

2. A MÓDSZER ELVE

[Ennek az analitikai módszernek a leírását felülvizsgálják az OIV hatóságai. A leírás egy későbbi bizottsági közleményben kerül közzétételre azt követően, hogy az OIV a felülvizsgált szöveget közzéteszi „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványa 2010-es kiadásában. A közzététel megtörténteig iránymutató jelleggel figyelembe lehet venni a 2676/90/EGK bizottsági rendelet mellékletének 4. fejezetét.]

4 A BORBAN LÉVŐ VÍZTARTALOM $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ IZOTÓPARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA (OIV-AS-2-09-MOU018) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER

(p.m.)

[Ennek az analitikai módszernek a leírását felülvizsgálják az OIV hatóságai. A leírás egy későbbi bizottsági közleményben kerül közzétételre azt követően, hogy az OIV a felülvizsgált szöveget közzéteszi „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványa 2010-es kiadásában. A közzététel megtörténteig iránymutató jelleggel figyelembe lehet venni a 2676/90/EGK bizottsági rendelet mellékletének 43. fejezetét.

5 FOLIN-CIOCALTEU INDEX (OIV-AS-2-10-INDFOL) – IV. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. MEGHATÁROZÁS

A Folin-Ciocalteu index az alább leírt módszer alkalmazásával kapott eredmény.

2. A MEGHATÁROZÁS ELVE

A borban található összes fenolvegyletet a Folin-Ciocalteu-reagens oxidálja. Ez a reagens foszfor-wolframsav ($H_3PW_{12}O_{40}$) és foszfor-molibdénsav ($H_3PMo_{12}O_{40}$) keverékéből áll, amely a fenolok oxidálását követően kék színű wolfram- (W_8O_{23}) és molibdén- (Mo_8O_{23}) oxiddá redukálódik.

A létrejött kék szín abszorpciós maximuma 750 nm-en van, mely arányos az eredetileg jelen lévő fenolvegyletek összes mennyiségével.

3. REAGENSEK

Ezeknek analitikai tisztaságúaknak kell lenniük. A felhasznált víznek desztillálnak vagy azzal egyenlő tisztaságúnak kell lennie.

3.1. Folin-Ciocalteu reagens

Ez a reagens kereskedelmi forgalomban felhasználásra készen kapható. El is készíthető a következőképpen: oldjunk fel 100 g nátrium-wolfrámot ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) és 25 g nátrium-molibdenátot ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) 700 ml desztillált vízben. Adjunk hozzá 50 ml 85 %-os foszforsavat ($p_{20} = 1,71$ g/ml) és 100 ml koncentrált sósavat ($p_{20} = 1,19$ g/ml). Forraljuk fel, és forraljuk 10 órán keresztül reflux körülmények között. Ezután adjunk hozzá 150 g lítium-szulfátot ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$) és néhány csepp brómot, és forraljuk ismét 15 percen keresztül. Hagyjuk lehűlni, és töltsük fel egy literre desztillált vízzel.

3.2. 20 % (m/V) nátrium-karbonát- (Na_2CO_3) oldat.

4. ESZKÖZÖK

Szokásos laboratóriumi eszközök, és különösen a következők:

4.1. 100 ml-es mérőlombikok.

4.2. Spektrofotométer, 750 nm-en történő méréshez.

5. ELJÁRÁS

5.1. Vörösbőr

Tegyük a következőket egy 100 ml-es mérőlombikba (4.1. pont), szigorúan az alábbi sorrendben:

1 ml bor, amelyet előzőleg 1:5 arányban hígítottunk,

50 ml desztillált víz,

5 ml Folin-Ciocalteu-reagens (3.1.),

20 ml nátrium-karbonát-oldat (3.2.).

Töltsük fel 100 ml-re desztillált vízzel.

Keveréssel homogenizáljuk. Várjunk 30 percig, hogy a reakció stabilizálódjon. Határozzuk meg az abszorban-
ciát 750 nm-en 1 cm-es fényúton, bor helyett desztillált vízzel készített vakpróbához viszonyítva.

Ha az abszorban-
cia nem 0,3 körüli, megfelelő hígítást kell készíteni.

5.2. Fehérbőr

Végezzük el ugyanezt az eljárást 1 ml hígítatlan borral.

5.3. Finomított mustsűrítmény

5.3.1. A minta előkészítése

Használjunk 25 % (m/m) (25° Brix) cukortartalmú oldatot, amelyet a pH-ról szóló fejezet 4.1.2. pontjában leírtak szerint készítettünk elő.

5.3.2. Mérés

Járjunk el ugyanúgy, mint ahogyan a vörösbor esetében (5.1. pont) az 5.3.1. pontban előkészített 5 ml minta felhasználásával, és mérjük meg az abszorbanciát 5 ml 25 % (m/m)-os invertcukoroldat segítségével elkészített kontrollhoz viszonyítva.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA**6.1. Számítási mód**

Az eredményt egy index formájában fejezzük ki, amelyet úgy kapunk, hogy az abszorbanciát 100-zal szorozzuk 1:5 arányban hígított vörösborok esetében (vagy a megfelelő tényezővel egyéb hígítások esetében), és 20-szal fehérborok esetén. Finomított mustsűrítmények esetén az abszorbanciát 16-tal szorozzuk.

6.2. Ismételhetőség

Az ugyanazon analitikus által párhuzamosan vagy nagyon gyorsan egymás után elvégzett két meghatározás eredményei közötti különbség nem lehet nagyobb, mint 1.

Az eredmények jó ismételhetőségét rendkívül gondosan megtisztított eszközök használatával érhetjük el (mérő-lombikok és küvetták).

6 GLÜKÓZ ÉS FRUKTÓZ (OIV-AS-311-02-GLUFU) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. MEGHATÁROZÁS

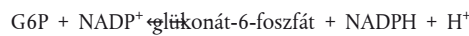
A glükóz és a fruktóz enzimatikusan meghatározható. Ez a meghatározás a glükóz-fruktóz arány számítására is használható.

2. A MÓDSZER ELVE

A glükózt és a fruktózt az adenzin-5-trifoszfáttal (ATP) a hexokináz (HK) enzim által katalizált enzimátikus reakció során foszforozza, és glükóz-6-foszfátot (G6P), valamint fruktóz-6-foszfátot (F6P) hoz létre:



A glükóz-6-foszfátot először a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP) glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) enzim jelenlétében glükonát-6-foszfáttá oxidálja. A keletkezett redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) mennyisége arányos a glükóz-6-foszfáttal, így a glükózzal.



A redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (NADPH) 340 nm-en mért abszorpciója alapján határozzuk meg.

E reakció végén a fruktóz-6-foszfát glükóz-6-foszfáttá alakul a foszfolükóz-izomeráz (PGI) hatására:



A glükóz-6-foszfát ismét reakcióba lép a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfáttal, és glükonát-6-foszfátot és redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (NADPH) hoz létre, ez ismét meghatározható.

3. ESZKÖZÖK

— Spektrofotométer, amely lehetővé teszi 340 nm-en a mérést, azon a hullámhosszon, amelyen az NADPH abszorpciója a maximumán van. Mivel abszolút mérésekről van szó (a számításokhoz nem kalibrációs görbéket, hanem az NADPH moláris abszorpciók együtthatóját használjuk), ezért a készülék hullámhossz pontosságát és az abszorpció linearitását ellenőrizni kell.

Ha a fenti spektrofotométer nem áll rendelkezésre, nem folytonos spektrumú fotométer is használható, amely lehetővé teszi a méréseket 334 nm-nél vagy 365 nm-nél.

— 1 cm fényúttal rendelkező üvegvüetvák vagy egyszer használatos vüetvák.

— Pipetták az enzimes mintaoldatokhoz, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 ml.

4. REAGENSEK

- 4.1. **1. oldat:** pufferoldat (0,3 M trietanolamin pH = 7,6; 4×10^{-3} M en Mg^{2+}): oldjunk fel 11,2 g trietil-alkoholamin-hidrokloridot ($\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$) és 0,2 g $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -t 150 ml kétszer desztillált vízben, és adjunk hozzá mintegy 4 ml 5 M nátrium-hidroxid-oldatot (NaOH), hogy 7,6 pH-értéket kapjunk, és töltsük fel 200 ml-re.

Ez a pufferoldat négy hétig tartható el + 4 °C hőmérsékleten.

- 4.2. **2. oldat:** nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oldat (kb. $11,5 \times 10^{-3}$ M): oldjunk fel 50 mg dinátrium-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot 5 ml kétszer desztillált vízben.

Ez az oldat négy hétig tartható el + 4 °C hőmérsékleten.

- 4.3. **3. oldat:** adenzin-5'-trifoszfát-oldat (kb. 81×10^{-3} M): oldjunk fel 250 mg dinátrium-adenozin-5'-trifoszfátot és 250 mg nátrium-hidrogén-karbonátot 5 ml kétszer desztillált vízben.

Ez az oldat négy hétig tartható el + 4 °C hőmérsékleten.

- 4.4. **4. oldat:** hexokináz/glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz: keverjük össze 0,5 ml hexokinázt (2 mg fehérje/ml, azaz 280 U/ml) 0,5 ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenázzal (1 mg fehérje/ml).

Ez az oldat egy évig tartható el kb. +4 °C hőmérsékleten.

- 4.5. **5. oldat:** foszfoglikóz-izomeráz (2 mg fehérje/ml, azaz 700 U/ml). A szuszpenziót hígítás nélkül használjuk.

Ez az oldat egy évig tartható el kb. +4 °C hőmérsékleten.

Megjegyzés:

A titráláshoz szükséges összes reagens kapható kereskedelmi forgalomban.

5. ELJÁRÁS

5.1. A minta előkészítése

A glükóz és fruktóz várható koncentrációjától függően hígítsuk a mintát az alábbiak szerint:

Mérés 340 és 334 nm-en	Mérés 365 nm-en	Hígítás vízzel	F hígítási tényező
0,4 g/l-ig	0,8 g/l	—	—
4,0 g/l-ig	8,0 g/l	1 + 9	10
10,0 g/l-ig	20,0 g/l	1 + 24	25
20,0 g/l-ig	40,0 g/l	1 + 49	50
40,0 g/l-ig	80,0 g/l	1 + 99	100
40,0 g/l fölött	80,0 g/l fölött	1 + 999	1 000

5.2. Titrálás

340 nm-es hullámhosszra beállított spektrofotométerrel végezzük el a méréseket, levegőt (nincs küvetta a fényútban) vagy vizet használva referenciaként.

Hőmérséklet legyen 20 °C és 25 °C között.

Két küvetta, amelyek fényútja 1 cm, helyezünk az alábbiakat:

	Referenciaküvetta	Mintaküvetta
1. oldat (4.1.) 20 °C-ra beállítva	2,50 ml	2,50 ml
2. oldat (4.2.)	0,10 ml	0,10 ml
3. oldat (4.3.)	0,10 ml	0,10 ml
Mérendő minta		0,20 ml
Kétszer desztillált víz	0,20 ml	

Keverjük össze, majd kb. három perc múlva olvassuk le az oldatok abszorbanciáját (A₁). Az alább oldat hozzáadásával indítsuk be a reakciót:

4. oldat (4.4.)	0,02 ml	0,02 ml
-----------------	---------	---------

Keverjük össze; várjunk 15 percet; olvassuk le az abszorbanciát, és ellenőrizzük, hogy a reakció további két perc múlva befejeződött-e (A₂).

Ezt követően rögtön adjuk hozzá a következő oldatot:

5. oldat (4.5.)	0,02 ml	0,02 ml
-----------------	---------	---------

Keverjük össze; olvassuk le 10 perc múlva az abszorbanciát; és ellenőrizzük, hogy újabb két perc elteltével megállt-e a reakció (A₃).

Számítsuk ki a referenciaküvettről és a mintaküvettről az abszorbanciák közötti különbséget:

A₂ – A₁ megfelel a glükóznak,

A₃ – A₂ megfelel a fruktóznak,

Számítsuk ki az abszorbancki különbségeket a referenciaküvetára (ΔA_T) és a mintaküvetára (ΔA_D), és ebből az alábbiakat:

glükóz esetén: $\Delta A_G = \Delta A_D - \Delta A_T$

fruktóz esetén: $\Delta A_F = \Delta A_D - \Delta A_T$

Megjegyzés:

Az enzímreakció befejeződéséhez szükséges idő tétlről tételre változhat. A fent megadott időtartam csak iránymutató jellegű, és ajánlatos azt meghatározni minden egyes tételhez.

5.3. Az eredmények megadása

5.3.1. Számítás

A koncentráció kiszámításának általános képlete a következő:

$$C = ((V \times PM) / (\epsilon \times d \times v \times 1\,000)) \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = a tesztoldat térfogata (ml)

v = a mintaoldat térfogata (ml)

PM = a meghatározandó anyag molekulatömege

d = a küvetta fényútja (cm)

ϵ = az NADPH abszorpció együtthatója 340 nm-en = $6,3 \text{ (mmol}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1}\text{)}$

V = 2,92 ml a glükóz meghatározásához

V = 2,94 ml a fruktóz meghatározásához

v = 0,20 ml

PM = 180

d = 1.

így tehát

glükóz esetén: $C \text{ (g/l)} = 0,417 \times \Delta A_G$

fruktóz esetén: $C \text{ (g/l)} = 0,420 \times \Delta A_F$

Ha a mintát előkészítése során hígították, szorozzuk be az eredményt az F hígítási tényezővel.

Megjegyzés:

Ha a méréseket 334 vagy 365 nm-en végeztük, az alábbi értékeket kapjuk:

— mérés 334 nm-en: $\epsilon = 6,2 \text{ (mmole}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1}\text{)}$

glükóz esetén: $C \text{ (g/l)} = 0,425 \times \Delta A_G$

fruktóz esetén: $C \text{ (g/l)} = 0,428 \times \Delta A_F$

— mérés 365 nm-en: $\epsilon = 3,4 \text{ (mmole}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1}\text{)}$

glükóz esetén: $C \text{ (g/l)} = 0,773 \times \Delta A_G$

fruktóz esetén: $C \text{ (g/l)} = 0,778 \times \Delta A_F$

5.3.2. Ismételtesség (r)

$$r = 0,056 \ x_i$$

5.3.3. Reprodukálhatóság (R)

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

x_i = a glükóz, illetve a fruktóz koncentrációja g/l-ben.

**7 CUKOR MEGHATÁROZÁSA NAGYTELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC)
(SZACHARÓZ) (OIV-AS-311-03-SUCRES) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER**

(p.m.)

[Ennek az analitikai módszernek a leírását felülvizsgálják az OIV hatóságai. A leírás egy későbbi bizottsági közleményben kerül közzétételre azt követően, hogy az OIV a felülvizsgált szöveget közzéteszi „A borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványa 2010-es kiadásában. A közzététel megtörténteig iránymutató jelleggel figyelembe lehet venni a 2676/90/EGK bizottsági rendelet melléklete 6. fejezetének 3. pontját.]

**8 A MUST, SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY, FINOMÍTOTT SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY ÉS BOR FELJAVÍTÁSÁNAK
KIMUTATÁSA A DEUTÉRIUM MÁGNESES MAGREZONANCIÁS MÉRÉSÉVEL (SNIF-NMR/RMN-FINS) (OIV-
AS-311-05-ENRRMN) – I. TÍPUSÚ MÓDSZER**

(p.m.)

[Ennek az analitikai módszernek a leírását felülvizsgálják az OIV hatóságai. A leírás egy későbbi bizottsági közleményben kerül közzétételre azt követően, hogy az OIV közgyűlése elfogadja a végleges szöveget. E határozat meghozataláig iránymutató jelleggel figyelembe lehet venni a 2676/90/EGK bizottsági rendelet mellékletének 8. fejezetét.]

**9 TÉRFOGATSZÁZALÉKBAN MEGHATÁROZOTT ALKOHOLTARTALOM (OIV-AS-312-01-TALVOL) – I.
TÍPUSÚ MÓDSZER**

(p.m.)

[Ezeknek az analitikai módszereknek a leírását felülvizsgálják az OIV hatóságai. A leírások egy későbbi bizottsági közleményben kerülnek közzétételre, mielőtt azokat az OIV közzéteszi a „Borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve című” kiadványa 2010-es kiadásában. A közzététel megtörténteig iránymutató jelleggel figyelembe lehet venni a 2676/90/EGK bizottsági rendelet mellékletének 3. fejezetét.]

10 SZŐLŐMUST, SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY VAGY FINOMÍTOTT SZŐLŐMUSTSÚRÍTMÉNY FERMENTÁLÁSÁVAL ELŐÁLLÍTOTT BORALKOHOL VAGY ETANOL $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ IZOTÓPARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA IZOTÓPOS TÖMEGSPEKTROMETRIÁVAL (OIV-AS-312-06-ETHANO) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. ALKALMAZÁSI TERÜLET

A módszer lehetővé teszi szőlőből készült termékek (must, szőlőmustsűrítmény, finomított szőlőmustsűrítmény) fermentálásával előállított boralkohol és etanol $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -izotóparányának meghatározását.

2. REFERENCIASZABVÁNYOK

ISO: 5725:1994 „A meghatározási módszerek és eredmények pontossága (hibátlanóság és pontosság): alpmódszer egy szabványos mérési módszer ismételtelhetőségének és reprodukálhatóságának meghatározására”

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnit ($R_{\text{PDB}} = 0,0112372$).

OIV módszer AS-311-O5-ENRRMN „A szőlőmust, szőlőmustsűrítmény, finomított szőlőmustsűrítvány és bor feljavításának kimutatása a deutérium mágneses magrezonanciás mérésével (SNIF-NMR).”

3. KIFEJEZÉSEK ÉS MEGHATÁROZÁSOK

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: szén-13 (^{13}C)- és szén-12 (^{12}C)-izotópok aránya egy adott mintában.

$\delta^{13}\text{C}$: szén-13 (^{13}C)-tartalom ezrelékben (‰) kifejezve.

SNIF-NMR: a vizsgált természetes izotóp frakcionálása mágneses rezonanciával.

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnit. A PDB a 13-as szénizotóp-tartalom természetes változatainak mérésére szolgáló elsődleges referenciaanyag, amely a dél-karolinai (USA) Pee-Dee formációból származó krétakori belemnitből előállított kalcium-karbonátból áll. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -izotóparánya (vagy R_{PDB}) 0,0112372. A PDB-készletek már régóta kimerültek, mégis ez maradt a 13-as szénizotóp-tartalom természetes változatainak kifejezésére használt elsődleges referencia, amely szerint a bécsi Nemzetközi Atomenergia-ügynökségtől (IAEA) beszerezhető referenciaanyagokat kalibrálják. A természetben előforduló szén-13 izotópos előfordulását hagyományosan a V-PDB arányában fejezzük ki.

m/z: tömeg/töltés arány.

4. A MEGHATÁROZÁS ELVE

A fotoszintézis során a szén-dioxid asszimilációja a növényekben két fő anyagcsere útján történik, a C_3 -metabolizmuson (Calvin-ciklus) és a C_4 -metabolizmuson (Hatch és Slack) keresztül. E két fotoszintetikus mechanizmus különböző típusú izotópfractionálást jelent. A C_4 -növényekből származó termékek, így például a cukrok és fermentációval keletkező alkohol nagyobb mennyiségű 13-as szénizotópot tartalmaznak, mint a C_3 -növények hasonló termékei. A legtöbb növény, így a szőlő és a cukorrépa is a C_3 -csoportba tartozik. A cukornád és a kukorica viszont a C_4 -csoportba tartoznak. A ^{13}C -tartalom mérése lehetővé teszi a szőlőtermékekhez (szőlőmust, bor stb.) hozzáadott C_4 -eredetű cukrok (cukornád- vagy kukorica-izoglükóz) kimutatását és kiértékelését. A ^{13}C -tartalomra és a SNIF-NMR-rel kapott adatok együttesen lehetővé teszik a C_3 - és C_4 -növényekből származó cukrok és alkoholok hozzáadott mennyiségeinek kvantitatív meghatározását.

A ^{13}C -tartalmat úgy határozzuk meg, hogy a minta teljes elégetése során képződő szén-dioxidot mérjük. A ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C és ^{12}C -izotópok különböző lehetséges kombinációiból származó fő tömeg-izotopomerek – a 44-es ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), a 45-ös ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ és $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) és a 46-os ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) – mennyiségét egy izotóparány-mérő tömegspektrométer három különböző kollektora által mért ionáramokból határozzuk meg. Alacsony koncentrációjuk miatt a $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ és $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ izotopomerek hozzájárulása elhanyagolható. Az m/z = 45-re kapott ionáramot korrigálni kell a $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ -ra, amelyet az m/z = 46-ra mért tényleges áramintenzitás alapján

kell kiszámítani, figyelembe véve a ^{18}O és ^{17}O relatív mennyiségét (Craig-korrektció). A nemzetközi referenciaanyaggal, a V-PDB-vel kalibrált referenciaanyaggal történő összehasonlítás lehetővé teszi a ^{13}C -tartalom kiszámítását a relatív $\delta^{13}\text{C}$ -skálán.

5. REAGENSEK

A szükséges anyagok és eszközök a laboratóriumban használt berendezéstől függenek (6. pont). A leggyakrabban alkalmazott rendszerek elemanalizátorokon alapulnak. A rendszerekhez használhatók olyan kiegészítők, amelyek lehetővé teszik lezárt fémkapszulákban helyezett minták alkalmazását, vagy folyékony minták beinjektlását egy szeptumon keresztül, fecskendő alkalmazásával.

Az alkalmazott berendezéstől függően az alábbi referenciaanyagokat, reagenseket és eszközöket használhatjuk:

— referenciaanyagok

— az IEAE-től:

Név	Anyag	$\delta^{13}\text{C}$ a V-PDB (9)-hez képest
— IAEA-CH-6	Szacharóz	– 10,4 ‰
— IAEA-CH-7	Polietilén	– 31,8 ‰
— NBS22	Olaj	– 29,7 ‰
— USGS24	Grafit	– 16,1 ‰

— a geel-i (BE) IRMM-től (Eталonanyag- és Mérésügyi Intézet):

Név	Anyag	$\delta^{13}\text{C}$ a V-PDB (9)-hez képest
— CRM/BCR 656	Boralkohol	– 26,93 ‰
— CRM/BCR 657	Glükóz	– 10,75 ‰
— CRM/BCR 660	Vizes alkohololdat (alkoholtartalom: 12 ‰)	– 26,72 ‰

— nemzetközi referenciaanyagokkal kalibrált, ismert $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -arányú standard minta,

— continuous-flow (átfolyásos) rendszerekhez szükséges fogyóeszközök jegyzéke a teljesség igénye nélkül:

— hélium az analízishez (CAS 07440-59-7),

— oxigén az analízishez (CAS 07782-44-7),

— szén-dioxid az analízishez, másodlagos referenciagázként a ^{13}C -tartalom meghatározásához (CAS 00124-38-9),

— oxidációs reagens az égésterendszer kemencéjéhez, például réz(II)-oxid elemi analízishez (CAS 1317-38-0),

— vízmegkötő anyag az égés során keletkező víz eltávolítására, például anhidron-elemanalízishez (magnézium-perklorát) (CAS 10034-81-8) (nem szükséges olyan berendezésekhez, amelyekben van kriogén-cspadékkal vagy szelektív permeabilis kapillárisokkal működő vízeltávolító rendszer).

6. KÉSZÜLÉKEK ÉS BERENDEZÉSEK

6.1. Izotóparány-tömegspektrométer (IRMS)

Természetes előfordulású CO_2 -gáz relatív ^{13}C -tartalmának legalább 0,05 ‰ belső pontosságú relatív értékben (9. pont) kifejezett meghatározására alkalmas izotóparány-tömegspektrométer (IRMS). A belső pontosság itt ugyanannak a CO_2 -mintának a két mérése közötti különbséget jelenti. Az izotóparányok mérésére alkalmazott tömegspektrométer általában hármass kollektorral van felszerelve, hogy egyszerre mérhesse az $m/z = 44$, 45 és 46 intenzitását. Az izotóparány-tömegspektrométernek vagy kettős bemeneti nyílással kell rendelkeznie, hogy felváltva tudja mérni az ismeretlen mintát és a referenciamintát, vagy tartalmaznia kell egy olyan integrált rendszert, amely elvégzi a minták kvantitatív elégetését, és elválasztja a szén-dioxidot a többi égéstermektől, mielőtt megtörténne a tömegspektrometriás mérés.

6.2. Égetőkészülék

Égetőkészülék, amely alkalmas etanol szén-dioxiddá történő kvantitatív átalakítására és az egyéb égéstermékek, ezen belül a víz eltávolítására az izotópok frakcionálása nélkül. A készülék lehet continuous-flow rendszer, amely a tömegspektrometriás berendezés részét képezi (6.2.1. pont), vagy egy külön égetőrendszer (6.2.2. pont). A készüléknek lehetővé kell tennie a legalább a 11. pontban megjelölt pontosságot.

6.2.1. Continuous-flow rendszerek

Ezek a rendszerek vagy egy elemanalizátort, vagy egy gázkromatográfot tartalmaznak az égetőrendszerrel sorba kötve.

A fémkapszulas minták fogadására alkalmas rendszerekhez az alábbi laboratóriumi eszközökre van szükség:

- kalibrált mikrofecskendő vagy mikropipetta megfelelő tűkkel,
- legalább 1 µg pontosságú mérleg,
- csipesz a kapszulázáshoz,
- ónkapszula folyékony mintákhoz,
- ónkapszula szilárd mintákhoz.

Megjegyzés:

az etanolminták párolgásának megakadályozása érdekében a kapszulákba beletehetünk egy nedvszívó anyagot is (például *Chromosorb W 45-60-as mesh*-számút), feltéve, ha előzőleg egy minta nélküli méréssel ellenőriztük, hogy nem tartalmaz olyan mennyiségű szenet, amely befolyásolná a mérések eredményét.

Egy folyadék injektorral felszerelt elemanalizátor vagy egy égetéses kromatográfias előkészítő rendszer alkalmazásakor az alábbi laboratóriumi eszközökre van szükség:

- fecskendő a folyadékokhoz,
- légmentesen záró rendszerrel és inert szeptumokkal felszerelt lombikok.

A fent felsorolt laboratóriumi eszközök csak példák, amelyek a laboratóriumban használt égető- és tömegspektrometriás készülék típusától függően más, azonos teljesítményű berendezésekkel is helyettesíthetők.

6.2.2. Külső előkészítő rendszer

A mérendő minták elégetésével előállított szén-dioxid-mintákat és a referenciamintákat gömblombikokba gyűjtjük, majd behelyezzük izotópanalízis céljából a spektrométer kettős bemenetébe. Sokféle, szakirodalomban ismertett égetőkészülék alkalmazható:

- keringő oxigénnel feltöltött zárt égetőrendszerek,
- hélium- és oxigénáramos elemanalizátorok,
- oxidálószerként réz(II)-oxiddal töltött, lezárt üveggömbök.

7. A VIZSGÁLANDÓ MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE

Az izotópvizsgálat előtt a borból ki kell vonni az etanolt. Ezt a bornak a SNIF-NMR módszer (OIV - MA-E-AS311-05-ENRRMN) 3.1. pontjában ismertett desztillálásával végezzük.

Szőlőmust, szőlőmustsűrítmény és finomított szőlőmustsűrítmény esetében a cukrokat először etanollá kell fermentálni a SNIF-NMR módszer (OIV - MA-E-AS311-05-ENRRMN) 3.2. pontjában leírtak szerint.

8. ELJÁRÁS

Az előkészítés minden lépését úgy kell végezni, hogy az etanol mennyiségében ne legyen jelentősebb párolgási veszteség, amely megváltoztatná a minta izotóp-összetételét.

Az alábbiakban egy, az etanolminták kereskedelmi forgalomban kapható automatikus égetőrendszerek segítségével történő elégetésére általánosan alkalmazott eljárást ismertetünk. Az izotópanalízishez szükséges széndioxid előállításához bármely egyéb olyan módszer is alkalmazható, amely biztosítja, hogy az etanolminta párolgási veszteség nélkül és teljes egészében szén-dioxiddá alakuljon át.

Elemanalizátor alkalmazásán alapuló kísérleti eljárás:

a) a minták kapszulába helyezése:

- használjunk kapszulákat, csipeszeket és egy tálcat, amelyek mindegyikének tisztának kell lennie,
- a csipesz segítségével fogjunk meg egy megfelelő méretű kapszulát,
- egy mikropipetta segítségével tegyünk megfelelő mennyiségű folyadékot a kapszulába,

— *Megjegyzés:*

2 mg szén előállításához 3,84 mg abszolút etanol vagy 4,17 mg 92 tömegszázalék alkoholtartalmú desztillátum kell. A desztillátum megfelelő mennyiségét ennek alapján kell kiszámolni, a tömegspektrometriás készülék érzékenysége szerint szükséges szénmennyiségnek megfelelően,

- a csipesz segítségével zárjuk le a kapszulát,
- minden kapszula legyen teljesen zárt. Ha nem az, el kell dobni, és új kapszulát kell készíteni,
- minden mintából két kapszulát kell készíteni,
- tegyük a kapszulákat az elemanalizátor automata mintavevőjén lévő tálca megfelelő helyére. Minden kapszulát gondosan el kell látni sorszámmal,
- helyezzük a referenciamintákat tartalmazó kapszulákat szisztematikusan a mintasorozatok elejére és végére,
- a mintasorozatokba szabályos közönként tegyünk egy-egy kontrollmintát;

b) az elemanalízis és a tömegspektrometriás készülék ellenőrzése és beállítása:

- a minta optimális elégetéséhez megfelelően állítsuk be az elemanalizáló kemencék hőmérsékletét és az oxigén- és héliumáramot,
- ellenőrizzük, hogy az elemanalizáló és a tömegspektrometriás készülék nem szívárogo-e (például úgy, hogy a N₂-nek megfelelő m/z = 28-nál ellenőrizzük az ionáramot),
- állítsuk be a tömegspektrométert m/z = 44-, 45- és 46-nál történő ionáram mérésre,
- a minták mérése előtt ismert kontrollminták alkalmazásával ellenőrizzük a rendszert;

c) a mérések elvégzése:

Az elemanalizátor (vagy a kromatográf) automata mintavevőjére helyezett minták sorban egymás után bekerülnek a rendszerbe. Az egyes minták elégetésekor képződő szén-dioxid átkerül a tömegspektrométerbe, ahol megtörténik az ionárammérés. A rendszerhez kapcsolt számítógép rögzíti a mért ionáramértékeket, és kiszámítja az egyes mintákhoz tartozó δ -értékeket (9. pont).

9. SZÁMÍTÁS

A módszer célja a borból vagy a szőlő fermentálásával előállított termékekből kinyert etanol ¹³C/¹²C -izotóp-arányának meghatározása. A ¹³C/¹²C-izotóp-arányt egy referenciamintától való eltéréssel fejezhetjük ki. A szén-13 izotópos eltérését ($\delta^{13}\text{C}$) ezután egy ezrelékes delta-skálán ($\delta/1\ 000$) számíthatjuk ki úgy, hogy összehasonlítjuk a mérendő mintával kapott eredményeket egy, az elsődleges nemzetközi referenciaminta (V-PDB) alapján előzetesen kalibrált referenciaminta eredményeivel. A $\delta^{13}\text{C}$ -értékeket a referenciához képest a következőképpen fejezzük ki:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{minta/referencia}} \text{‰} = 1\ 000 \times (R_{\text{minta}} - R_{\text{referencia}})/R_{\text{referencia}}$$

ahol az R_{minta} és az $R_{\text{referencia}}$ a minta és a referenciaként használt szén-dioxid ¹³C/¹²C-izotóp-aránya.

A $\delta^{13}\text{C}$ -értékeket a V-PDB-hez képest a következőképpen fejezzük ki:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{minta/V-PDB}} \text{ ‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{minta/referencia}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{referencia/V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{minta/referencia}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{referencia/V-PDB}})/1\,000$$

ahol a képletben a $\delta^{13}\text{C}_{\text{referencia/V-PDB}}$ a referenciaminta előzetesen meghatározott izotópos eltérése a V-PDB-től.

A berendezésben mérési feltételek változása miatt az egymás utáni mérések során kisebb eltérések tapasztalhatók. Ilyen esetben a minták $\delta^{13}\text{C}$ -értékeit a referenciaminta mért és valós $\delta^{13}\text{C}$ -értéke közötti különbségnek megfelelően kell korrigálni, és a valós $\delta^{13}\text{C}$ -értéket előzetesen a V-PDB-nek egy nemzetközi referenciaanyaggal történő összehasonlításával kell kalibrálni. Feltételezhetjük, hogy a referenciaminta két mérése közötti eltérés, és így a mintákkal kapott eredményekre alkalmazandó korrekció is lineáris. A referenciamintát minden mintasorozat előtt és után meg kell mérni, majd ezt követően lineáris interpoláció alkalmazásával számíthatjuk ki az egyes minták korrekcióját.

10. MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS ÉS -ELLENŐRZÉS

Ellenőrizzük, hogy a referenciaminta ^{13}C -értékének eltérése az elfogadható értéktől legfeljebb 0,5 ‰ legyen. Ha nagyobb, ellenőrizni kell, és szükség esetén módosítani kell a spektrométer beállításait.

Minden egyes minta esetében ellenőrizzük, hogy az egymás után lemért két párhuzamos kapszula eredményei közötti eltérés nem haladja meg a 0,3 ‰-ot. Egy minta végeredménye a két kapszulára kapott értékek átlaga. Ha az eltérés meghaladja a 0,3 ‰-ot, a mérést meg kell ismételni.

A mérés helyességének ellenőrzése történhet az $m/z = 44$ -nél mért ionáram alapján, amely arányos az elemalanizátorba injektált szén mennyiségével. Standard körülmények között az ionáramnak nagyrészt állandónak kell lennie a vizsgált mintákra. Jelentős eltérés jelezheti az etanol elpárolgását (például a kapszulák nem megfelelő zárása esetén) vagy az elemalanizátor, illetve a tömegspektrométer instabilitását.

11. A MÓDSZER TELJESÍTMÉNYÉNEK JELLEMZŐI (PONTOSSÁG)

Borból, valamint cukornádból és cukorrépából származó alkoholpárlat, továbbá ilyen kiindulóanyagok különböző keverékeit tartalmazó desztillátumokon laboratóriumok közötti körvizsgálatot végeztek (11.1. pont). Mivel ez a vizsgálat nem vette figyelembe a desztillációs eljárást, borokon végzett más laboratóriumok közötti körvizsgálatok (11.2. pont) adatait és különösen az izotópos mérésekkel kapcsolatos alkalmassági tesztsorozatokat (11.3. pont) is figyelembe vették. Az eredmények alapján megállapítható, hogy megfelelő körülmények között, és különösen a SNIF-NMR-es mérések körülményei között, különböző desztillációs rendszerek alkalmazása esetén nem jelentkeznek szignifikáns különbségek a boralkohol $\delta^{13}\text{C}$ -értékének meghatározásában. A bor mérése során megfigyelt pontossági jellemzők majdnem teljesen megegyeztek a desztillátumokkal végzett közös körvizsgálatok (11.1. pont) során kapottakkal.

11.1. Laboratóriumok közötti körvizsgálatok desztillátumokon

A laboratóriumok közötti körvizsgálat időpontja: 1996

A laboratóriumok száma: 20

Mintasám: Hat minta kettős vakpróba összehasonlításban

Vizsgálendő anyag: etanol $\delta^{13}\text{C}$ -értéke

Mintakód	Borászati eredetű alkohol	Cukorrépából származó alkohol	Cukornádból származó alkohol
A & G	80 %	10 %	10 %
B & C	90 %	10 %	0 %
D & F	0 %	100 %	0 %
E & I	90 %	0 %	10 %
H & K	100 %	0 %	0 %
J & L	0 %	0 %	100 %

Minta	A/G	B/C	D/F	E/I	H/K	J/L
Laboratóriumok száma a kieső eredmények kiszűrése után	19	18	17	19	19	19
Az elfogadott eredmények száma	38	36	34	38	38	38
Átlagérték ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 25,32	- 26,75	- 27,79	- 25,26	- 26,63	- 12,54
S_r^2	0,0064	0,0077	0,0031	0,0127	0,0069	0,0041
Az ismételhetőség szórása (S_r) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Ismételhetőségi határ r ($2,8 \times S_r$) ‰	0,22	0,25	0,16	0,32	0,23	0,18
S_r^2	0,0389	0,0309	0,0382	0,0459	0,0316	0,0584
A reprodukálhatóság szórása (S_R) ‰	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Reprodukálhatósági határ R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

11.2. Két boron és egy alkoholon végzett laboratóriumok közötti körvizsgálatok

A laboratóriumok közötti körvizsgálat időpontja: 1996

A laboratóriumok száma: 14 a bor desztillálásához, amelyből hét meg is mérte a boralkoholok $\delta^{13}\text{C}$ -értékét Nyolc az alkoholminta $\delta^{13}\text{C}$ -értékének méréséhez

Mintaszám: Három (9,3 % (V/V) fehérbor, 9,6 % (V/V) fehérbor és 93 % (m/m) alkohol)

Vizsgálendő anyag: etanol $\delta^{13}\text{C}$ -értéke

Minta	Vörösbor	Fehérbor	Alkohol
A laboratóriumok száma	7	7	8
Az elfogadott eredmények száma	7	7	8
Átlagérték ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 26,20	- 26,20	- 25,08
Reprodukálhatósági variancia $S_{r,2}$	0,0525	0,0740	0,0962
A reprodukálhatóság szórása (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Reprodukálhatósági határ R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,64	0,76	0,87

A részt vevő laboratóriumok különböző desztillációs rendszereket alkalmaztak. A résztvevők által visszaküldött összes desztillátumon egy-egy laboratóriumban elvégzett izotóp-meghatározások ($\delta^{13}\text{C}$) nem mutattak rendellenes értékeket, vagy olyanokat, amelyek szignifikánsan különböztek volna az átlagértéktől. Az eredmények szórása ($S^2 = 0,0059$) megfelelt a desztillátumokon végzett körvizsgálatban (11.1. pont) kapott ismételhetőségi varianciának (S_r^2).

11.3. Az izotópvizsgálatok elvégzésére való alkalmasság ellenőrzése érdekében elvégzett tanulmányok eredményei

1994 decembere óta rendszeresen szerveznek nemzetközi tanulmányokat a boron és alkoholon (96 % (V/V) desztillátumok) végzett izotópos mérésekben való jártasság tesztelésére. Az eredmények lehetővé teszik a részt vevő laboratóriumok számára, hogy ellenőrizzék az általuk végzett vizsgálatok minőségét. A statisztikai adatok alapján meghatározhatjuk a mérések reprodukálhatósági körülmények közötti varianciáját, és ezáltal megbecsülhetjük a variancia-paramétereket és a reprodukálhatósági határt. A borokban és desztillátumokban található etanolok $\delta^{13}\text{C}$ -meghatározásakor kapott eredmények az alábbi táblázatban találhatóak:

Időpont	Bor				Desztillátumok			
	N	S_R	S_R^2	R	N	S_R	S_R^2	R
1994. december	6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
1995. június	8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
1995. december	7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
1996. március	9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
1996. június	8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
1996. szeptember	10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
1996. december	10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
1997. március	10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
1997. június	11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49
1997. szeptember	12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
1997. december	11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
1998. március	12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
1998. június	12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
1998. szeptember	11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
Súlyozott átlag		0,215	0,046	0,60		0,209	0,044	0,59

N: részt vevő laboratóriumok száma.

11.4. Ismételtetőségi és reprodukálhatósági határok

A fenti táblázatokban megadott, különböző laboratóriumok közötti körvizsgálatok adatai alapján erre a módszerre – a desztillálási szakaszt is beleértve – az alábbi ismételtetőségi és reprodukálhatósági határokat állapíthatjuk meg:

ismételtetőségi határ r : 0,24

reprodukálhatósági határ R : 0,6.

11 ÖSSZES SAV (OIV-AS-313-01-ACITOT) – I. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. MEGHATÁROZÁS

Összes sav a titrálható savak összessége. A titrást lúgos mérőoldattal pH = 7 értékig végezzük.

Az összes savtartalom a szén-dioxidot nem tartalmazza.

2. A MÓDSZER ELVE

Potenciometrikus titrálás vagy titrálás brómtimolkék-indikátor mellett szín-összehasonlító oldatot használva.

3. REAGENSEK

3.1. Pufferoldat pH 7,0:

kálium-dihidrogén-foszfát (KH₂PO₄): 107,3 g

1 M nátrium-hidroxid (NaOH) oldat: 500 ml

víz: 1 000 ml.

Kereskedelmi forgalomban kapható referencia-pufferoldatok szintén használhatók.

3.2. 0,1 M nátrium-hidroxid (NaOH) oldat.

3.3. 4 g/l brómtimolkék-indikátoroldat:

brómtimolkék (C₂₇H₂₈Br₂O₅S) 4 g

semleges etil-alkohol, 96 % (V/V)..... 200 ml

Oldjuk fel, és adjunk hozzá:

CO₂-mentes víz 200 ml

Annyi 1 M nátrium-hidroxid-oldatot,

amely elegendő a kékeszöld szín létrehozásához (pH7) 7,5 ml

víz 1 000 ml

4. ESZKÖZÖK

4.1. Vízsugárszivattyú.

4.2. 500 ml-es vákuumlombik.

4.3. pH mérő és elektródok. Az üvegelektrodót desztillált vízben kell tartani. A kalomel/telített kálium-klorid elektródot telített kálium-klorid oldatban kell tárolni. Leggyakrabban kombinált elektródot használnak: ezt desztillált vízben kell tárolni.

4.4. 50 ml-es főzőpohár (bor), 100 ml-es főzőpohár (finomított szőlőmustsűrítmény).

5. ELJÁRÁS

5.1. A minta előkészítése

5.1.1. Bor

A szén-dioxid eltávolítása. Töltsünk kb. 50 ml bort egy vákuumlombikba; kapcsoljunk vákuumot a lombikra a vízsugárszivattyúval egy vagy két percen keresztül, miközben folyamatosan rázzuk.

5.1.2. Finomított mustsűrítmény

Töltsünk 200 g pontosan lemért finomított szőlőmustsűrítményt 500 ml-es mérőlombikba. Töltsük fel jelig vízzel, és homogenizáljuk.

5.2. Potenciometriás titrálás**5.2.1. A pH-mérő kalibrálása**

A pH-mérőt 20 °C hőmérsékleten történő használatra kalibráljuk a gyártó útmutatása szerint pH 7,00 pufferoldattal 20 °C hőmérsékleten.

5.2.2. Mérési módszer

Az 5.1. pontban meghatározottak szerint előkészített borminta 10 ml-ét, illetve a finomított mustsűrítmény oldat 50 ml-ét mérjük a főzőpohárba (4.4. pont), adjunk hozzá 10 ml desztillált vizet, és 0,1 M nátrium-hidroxid-oldattal (3.2. pont) pH 7,0-ig (20 °C) titráljuk. A lúgos oldatot lassan kell hozzáadni, és az oldatot folyamatosan rázni kell. Legyen n ml a hozzáadott 0,1 M nátrium-hidroxid oldat térfogata.

5.3. Titrálás indikátorral (brómtimolkék)**5.3.1. Előzetes vizsgálat: végpont színének meghatározása**

Főzőpohárba (4.4. pont) öntsünk 25 ml kiforralt desztillált vizet, 1 ml brómtimolkék-oldatot (3.3. pont) és az 5.1. pontban meghatározottak szerint előkészített borminta 10 ml-ét vagy finomított mustsűrítményoldat 50 ml-ét. Adjunk hozzá 0,1 M nátrium-hidroxid-oldatot (3.2. pont), amíg a szín kékeszöldre nem változik. Ezután adjunk hozzá 5 ml pH 7 értékű puffer oldatot (3.7.).

5.3.2. Meghatározás

Főzőpohárba (4.4. pont) öntsünk 30 ml kiforralt desztillált vizet, 1 ml brómtimolkék-oldatot (3.3. pont) és az 5.1. pontban meghatározottak szerint előkészített borminta 10 ml-ét vagy finomított mustsűrítményoldat 50 ml-ét. Adjunk hozzá 0,1 M nátrium-hidroxid-oldattal (3.2. pont), amíg ugyanazt a színt nem kapjuk, mint az előzetes vizsgálat során (5.3.1. pont). Legyen n ml a hozzáadott 0,1 M nátrium-hidroxid térfogata.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA**6.1. Számítási mód****6.1.1. Bor**

A milliekvivalens/l-ben kifejezett összes savtartalmat az alábbi összefüggés adja:

$$A = 10 n$$

Az eredményt egy tizedes pontossággal adjuk meg.

Az összes savtartalom borkősav g/l-ben kifejezve:

$$A' = 0,075 \times A$$

Az eredményt egy tizedes pontossággal adjuk meg.

6.1.2. Finomított mustsűrítmény

— A finomított mustsűrítmény milliekvivalens/kg-ban kifejezett összes savtartalma: $a = 5 \times n$

— Az összes cukortartalom egy kilogrammjára jutó milliekvivalensben kifejezett összes savtartalom az alábbi képlet szerint határozható meg:

$$A = (500 \times n)/(P)$$

P az összes cukortartalom %-ban (m/m).

Az eredményt egy tizedes pontossággal adjuk meg.

6.2. Ismételtetéség (r) indikátorral történő titrálás esetén(5.3)

$$r = 0,9 \text{ milliekvivalens/l}$$

$$r = 0,07 \text{ g/l borkősav}$$

fehér, rozé és vörösborokra.

6.3. Reprodukálhatóság (R) indikátorral történő titrálás esetén (5.3.):

Fehér és rozé borok esetén:

$R = 3,6$ milliekvivalens/l

$R = 0,3$ g/l borkősav

Vörösborok esetén:

$R = 5,1$ milliekvivalens/l

$R = 0,4$ g/l borkősav

12 ILLÓSAVTARTALOM (OIV-AS-313-02-ACIVOL) – I. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. MEGHATÁROZÁS
Az illósavtartalom a borban szabad vagy kötött állapotban lévő szerves savak, többnyire ecetsavak összessége.
2. A MÓDSZER ELVE
A borból vízgőzdesztillációval elkülönített illósavakat titráljuk.

A szén-dioxidot titrálás előtt el kell távolítani a borból.

A vízgőzdesztilláció során átdesztillált szabad és kötött kén-dioxid mennyiségét le kell vonni az illósavtartalomból.

A borhoz adott szorbinsavat is le kell vonni.

Megjegyzés:
Az egyes országokban az analízis előtt a bor stabilizálására használt szalicilsav egy része jelen lehet a párlatban. Ezt meg kell határozni, és az illósavtartalomból le kell vonni. A meghatározás módját e fejezet 7. szakasza írja le.
3. REAGENSEK
 - 3.1. Kristályos borkősav ($C_4H_6O_6$).
 - 3.2. 0,1 M nátrium-hidroxid-oldat (NaOH).
 - 3.3. 1 %-os fenolftalein-oldat 96 % (V/V)-os semleges alkoholban.
 - 3.4. 1:4 (V/V) hígítású sósav ($\rho_{20} = 1,18-1,19$ g/ml)
 - 3.5. 0,005 M jód- (I_2) oldat.
 - 3.6. Kristályos kálium-jodid (KI).
 - 3.7. 5 g/l keményítő oldat.

Adjunk 5 g keményítőt kb. 500 ml vízhez. Folyamatos keverés mellett forraljuk fel, majd forraljuk 10 percen keresztül; adjunk hozzá 200 g nátrium-kloridot. Ha kihűlt, töltsük fel egy literre.
- 3.8. Telített nátrium-borát-oldat ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), mintegy 55 g/l 20 °C hőmérsékleten.
4. ESZKÖZÖK
 - 4.1. Vízgőz-desztillációs készülék, amely az alábbiakból áll:
 - 1) vízgőzfejlesztő berendezés; a gőz nem tartalmazhat szén-dioxidot;
 - 2) gőzcsővel ellátott lombik;
 - 3) rektifikáló oszlop;
 - 4) hűtő.Ennek a berendezésnek az alábbi feltételeket kell teljesíteni:
 - a) Öntsünk 20 ml kiforralt vizet a lombikba. Gyűjtsünk össze 250 ml párlatot, és adjunk hozzá 0,1 ml 0,1 M nátrium-hidroxid-oldatot (3.2. pont) és két csepp fenolftaleinoldatot (3.3. pont). A rózsaszín elszíneződésnek meg kell maradnia legalább 10 másodpercig (azaz a gőznek mentesnek kell lennie a széndioxidtól).
 - b) Töltsünk 20 ml 0,1 M ecetsavoldatot a lombikba. Gyűjtsünk össze 250 ml desztillátumot. Titráljuk 0,1 M nátrium-hidroxid-oldattal (3.2. pont). Legalább 19,9 ml-t kell titrálni (azaz az ecetsavnak legalább 99,5 %-a átdesztillált a vízgőzzel).

- c) Öntsünk 20 ml 1 M-os tejsavoldatot a lombikba. Gyűjtsünk össze 250 ml párlatot, és titráljuk a savat 0,1 M nátrium-hidroxid-oldattal (3.2. pont).

A hozzáadott nátrium-hidroxid térfogata 1,0 ml vagy annál kevesebb kell, hogy legyen (azaz az átdesztillált tejsav mennyisége 0,5 %-nál nem több).

Minden készülék és eljárás mód, amely kielégíti a fenti követelményeket, hivatalosan nemzetközileg elfogadott.

- 4.2. Vízugárszivattyú.

- 4.3. Vákuumlombik.

5. ELJÁRÁS

- 5.1. **A minta előkészítése: széndioxid eltávolítása.**

Öntsünk kb. 50 ml bort vákuumlombikba; helyezzük a lombikot vízugárszivattyú segítségével vákuum alá egy vagy két percig, folyamatosan rázva.

- 5.2. **Vízgőz-desztilláció**

Öntsünk 20 ml, az 5.1. pontban meghatározottak szerint szén-dioxid-mentesített bort a lombikba. Adjunk hozzá kb. 0,5 g borkósavat (3.1. pont). Gyűjtsünk össze legalább 250 ml desztillátumot.

- 5.3. **Titrálás**

Titráljuk a párlatot 0,1 M nátrium-hidroxid-oldattal (3.2. pont) indikátorként két csepp fenoltaleint használva (3.3. pont). Legyen n ml a felhasznált nátrium-hidroxid térfogata.

Adjunk hozzá négy csepp 1:4 hígítású sósavat (3.4. pont), 2 ml keményítőoldatot (3.3. pont) és néhány kristály kálium-jodidot (3.6. pont). Titráljuk a szabad kén-dioxidot 0,005 M jóddal (3.5. pont). Legyen n' ml a felhasznált térfogat.

Adjunk hozzá telített nátrium-borát-oldatot (3.8. pont), amíg a rózsaszín elszíneződés újból megjelenik. Titráljuk a kötött kén-dioxidot 0,005 M jóddal (3.5. pont). Legyen n'' ml a felhasznált térfogat.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

- 6.1. **Számítási mód**

A milliekvivalens/l-ben kifejezett illósvartartalom egy tizedes pontosságig az alábbi összefüggés szerint határozható meg:

$$A = 5 (n - 0,1 n' - 0,05 n'')$$

A g/l ecetsavban kifejezett illósvartartalom két tizedes pontosságig az alábbiak szerint határozható meg:

$$0,300 (n - 0,1 n' - 0,05 n'').$$

- 6.2. **Ismételhetőség (r)**

$$r = 0,7 \text{ milliekvivalens/l}$$

$$r = 0,04 \text{ g/l ecetsav.}$$

- 6.3. **Reprodukálhatóság (R)**

$$R = 1,3 \text{ milliekvivalens/l}$$

$$R = 0,08 \text{ g/l ecetsav.}$$

- 6.4. **Szorbinsav tartalmú bor**

Mivel a szorbinsav 96 %-a vízgőzdesztillációval átmegy a 250 ml térfogatú párlatba, ennek savasságát le kell vonni az illósvartartalomból. 100 mg szorbinsav 0,89 milliekvivalens vagy 0,053 g ecetsavnak felel meg. A szorbinsavtartalmat mg/l-ben, a 18. számú módszer szerint határozhatjuk meg.

7. A SZALICILSAV MEGHATÁROZÁSA AZ ILLÓSAV-DESZTILLÁTUMBÓL

- 7.1. **A módszer elve**

Az illósvartartalom meghatározása és a kén-dioxidra történő korrekció után a szalicilsav jelenlétét az oldat savanyítása után, ha vas(III)-sót adunk hozzá, ibolyaszínű elszíneződés jelzi.

A desztillátumba az illósvartartalommal együtt átkerült szalicilsav meghatározását egy második desztillátumból végezzük, amely azonos térfogatú, mint amelyből az illósvartartalom meghatározását végeztük. Ebben a desztillátumban a szalicilsav-tartalmat összehasonlító kolorimetriás módszerrel határozzuk meg. Ezt levonjuk az illósvapárlat savtartalmából.

7.2. Reagensek

- 7.2.1. Sósav (HCl) ($p_{20} = 1,18$ à $1,19$ g/ml).
- 7.2.2. 0,1 M nátrium-tioszulfát- ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) oldat.
- 7.2.3. 10 % (m/V) vas(III)-ammónium-szulfát-oldat [$\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \times 24 \text{H}_2\text{O}$].
- 7.2.4. 0,01 M nátrium-szalicilát-oldat. 1,60 g/l nátrium-szalicilátot ($\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_3$) tartalmazó oldat.

7.3. Eljárás

- 7.3.1. Szalicilsav kimutatása az illósvapárlatban.

Közvetlenül az illósvav-meghatározás és a szabad és kötött kén-dioxidra történő korrekció után töltünk egy Erlenmeyer-lombikba 0,5 ml sósavat (7.2.1. pont), 3 ml 0,1 M nátrium-tioszulfát-oldatot (7.2.2. pont) és 1 ml vas(III)-ammónium-szulfát-oldatot (7.2.3. pont).

Szalicilsav jelenlétében, ibolyaszínű elszíneződés jelenik meg.

- 7.3.2. Szalicilsav meghatározása

A fent említett Erlenmeyer-lombikon jelöljük meg a desztillátum térfogatát, öntsük ki a desztillátumot, és öblítsük ki a lombikot.

Vízgőzdesztillációval desztilláljunk át 20 ml új bormintát, és gyűjtsük össze a párlatot az Erlenmeyer-lombikban a jelig. Adjunk hozzá 0,3 ml tömény sósavat (7.2.1. pont) és 1 ml vas(III)-ammónium-szulfát-oldatot (7.2.3. pont). Az Erlenmeyer-lombikban az oldat színe ibolyaszínűre változik.

Egy ugyanolyan Erlenmeyer-lombikba, mint amit a jellel megjelöltünk, öntsünk desztillált vizet a jelig. Adjunk hozzá 0,3 ml tömény sósavat (7.2.1. pont) és 1 ml vas(III)-ammónium-szulfát-oldatot (7.2.3. pont). Bürettából engedjük hozzá 0,01 M nátrium-szalicilát-oldatot (7.2.4. pont) mindaddig, amíg ugyanolyan intenzitású ibolyaszínt kapunk, mint a desztillátum színe.

Legyen n''' a bürettából hozzáadott oldat térfogata ml-ben.

- 7.4. Az illósvartartalom korrigálása

Vonjuk le a $0,1 \times n'''$ ml-t az illósvartartalom meghatározása során a desztillátum savasságának titrálásához használt 0,1 M nátrium-hidroxid-oldat n ml térfogatából.

13 CITROMSAV (OIV -AS-313-09-ACIENZ) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZER ELVE

A citromsavat oxálacetáttá és acetáttá alakítjuk egy citrát-liázzal (CL) katalizált reakcióban:

Citrát-oxálacetát + acetát

Malát-dehidrogenáz (MDH) és laktát-dehidrogenáz (LDH) jelenlétében az oxál-acetát és annak dekarboxilezési terméke a piruvát, L-maláttá és L-laktáttá redukálódik a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) segítségével:

oxálacetát + NADH + H⁺ → malát + NAD⁺

piruvát + NADH + H⁺ → laktát + NAD⁺

Az NAD⁺-á oxidált NADH-mennyiség ezekben a reakciókban arányos a jelenlévő citrát mennyiségével. Az NADH oxidációját az abszorbancia ebből eredő csökkenésével mérjük 340 nm hullámhosszon.

2. REAGENSEK

2.1. Pufferoldat pH 7,8

(0,51 M glicil-glicin; pH 7,8; Zn²⁺(0,6 × 10⁻³M):

oldjunk fel 7,13 g glicil-glicint kb. 70 ml kétszer desztillált vízben.

Állítsuk be a pH-értéket 7,8-ra kb. 13 ml 5 M nátrium-hidroxid oldattal, adjunk hozzá 10 ml cink-klorid-oldatot (80 mg ZnCl₂ 100 ml H₂O-ban), és töltsük fel 100 ml-re kétszer desztillált vízzel.

Az oldat legalább négy hétig eltartható 4 °C-os hőmérsékleten.

2.2. Redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid- (NADH) oldat (kb. 6 × 10⁻³ M): oldjunk fel 30 mg NADH-t és 60 mg NaHCO₃-t 6 ml kétszer desztillált vízben.

2.3. Malát-dehidrogenáz/laktát-dehidrogenáz-oldat (MDH/LDH) (0,5 mg MDH/ml, 2,5 mg LDH/ml): keverjük össze 0,1 ml

MDH-t (5 mg MDH/ml), 0,4 ml 3,2 M ammónium-szulfát-oldatot és 0,5 ml (5 mg/ml) LDH-t. Ez a szuszpenzió eltartható legalább egy évig 4 °C hőmérsékleten.

2.4. Citrát-liáz (CL, 5 mg fehérje/ml): oldjunk fel 168 mg liofilizátumot 1 ml jéghideg vízben. Ez az oldat 4 °C hőmérsékleten legalább egy hétig, ha pedig lefagyasztjuk, legalább négy hétig eltartható.

Ajánlatos a meghatározás előtt az enzimaktivitást ellenőrizni.

2.5. Polivinilpolipirrolidon (PVPP)

Megjegyzés: A meghatározáshoz szükséges összes reagens kapható kereskedelmi forgalomban.

3. ESZKÖZÖK

3.1. Spektrofotométer, amellyel 340 nm-en lehet méréseket végezni, amely hullámhosszon az NADH-abszorpció maximuma van.

Ennek hiányában, nem folytonos spektrumú fotométer is használható, amely lehetővé teszi a méréseket 334 vagy 365 nm-en. Mivel abszolút abszorbanciamérések történnek (azaz kalibrációs görbéket nem használunk, de standardizálás történik a NADH abszorpciókoefficiensének figyelembevételével), a készülék hullámhosszpon-tosságát és az abszorpciólinearitását ellenőrizni kell.

3.2. Üvegküvettek 1 cm-es fényúttal vagy egyszer használatos küvettek.

3.3. Mikropipetták 0,02–2 ml közötti térfogatok pipettázására.

4. A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

A citrátmeghatározást normál esetben közvetlenül a borból végezzük előzetes színtelenítés és hígítás nélkül, feltéve hogy a citromsavtartalom kevesebb, mint 400 mg/l. Egyébként hígítsuk a bort mindaddig, amíg a citrát-koncentráció 20 és 400 mg/l között lesz (azaz 5 és 80 µg között a mintarészben).

A fenolvegületekben gazdag vörösborok esetében PVPP-vel való előzetes kezelés ajánlott:

készítsünk kb. 0,2g PVPP-ből vizes szuszpenziót, és hagyjuk állni 15 percig. Szűrjük át szűrőpapíron.

Öntsünk 10 ml bort egy 50 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjuk hozzá a nedves PVPP-t, amelyet eltávolítottunk a szűrőről egy spatula segítségével. Rázzuk két-három percig, majd szűrjük át.

5. ELJÁRÁS

A spektrofotométert 340 nm-es hullámhosszra beállítva határozzuk meg az abszorbanciát az 1 cm-es küvetta használatával, levegőt használva zéró abszorbancia (referencia) standardként (nincs küvetta a fényútban). Helyezzük a következőket az 1 cm-es küvettaiba:

	referenciaküvetta	mintaküvetta
2.1. oldat	1,00 ml	1,00 ml
2.2. oldat	0,10 ml	0,10 ml
Mérendő minta	—	0,20 ml
Kétszer desztillált víz	2,00 ml	1,80 ml
2.3. oldat	0,02 ml	0,02 ml

Keverjük össze, és kb. öt perc múlva olvassuk le a referencia és a minta abszorbanciáját (A_1).

Adjunk hozzá:

2.4. oldatot	0,02 ml	0,02 ml
--------------	---------	---------

Keverjük össze; várjuk meg, amíg a reakció befejeződik (kb. öt perc), és olvassuk le a referencia és a minta abszorbanciáit (A_2).

Számítsuk ki az abszorbanciakülönbségeket ($A_1 - A_2$) a referenciaküvetta (ΔA_T) és a mintaküvetta (ΔA_D).

Végül számoljuk ki ezen különbségek közötti különbséget.

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

Megjegyzés: Az enzimreakció befejeződéséhez szükséges idő tételről tételre változhat. A fenti érték csak iránymutató jellegű. Ajánlatos azt minden tételre meghatározni.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

A citromsav-koncentrációt mg/l-ben adjuk meg, egész számban kifejezve.

6.1. Számítási mód

A koncentráció mg/l-ben történő kiszámításához az alábbi általános képlet használható:

$$C = ((V \times PM)/(\epsilon \times d \times v)) \times \Delta A$$

V = a vizsgálandó oldat térfogata ml-ben (itt 3,14 ml)

v = a minta térfogata ml-ben (itt 0,2 ml)

P.M = a meghatározandó anyag molekulatömege (itt a tiszta citromsavra M = 192,1)

d = a küvetta fényútja (itt 1 cm)

ϵ = az NADH abszorpció együtthatója; 340 nm-nél,

$$\epsilon = 6,3 \text{ (mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}\text{)}$$

így tehát

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

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

Megjegyzés: 334 nm-nél: $C = 488 \times \Delta A$ ($\epsilon = 6,2 \text{ m mol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$).

365 nm-nél: $C = 887 \times \Delta A$ ($\epsilon = 3,4 \text{ m mol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$).

6.2. Ismételhetség (r)

400 mg/l-nél kisebb citromsav-koncentráció: $r = 14 \text{ mg/l}$.

400 mg/l-nél nagyobb citromsav-koncentráció: $r = 28 \text{ mg/l}$.

6.3. Reprodukálhatóság (R)

400 mg/l-nél kisebb citromsav-koncentráció: $R = 39 \text{ mg/l}$.

400 mg/l-nél nagyobb citromsav-koncentráció: $R = 65 \text{ mg/l}$.

14 SZORBINSAV (OIV-AS-313-14-ACISOR) – IV. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZEREK ELVE

1.1. **Meghatározás ultraibolya tartományban abszorpciós spektrofotometriával**

A vízgőzdesztillációval elválasztott szorbinsavat (2,4-hexadiénsav) a desztillátumban ultraibolya tartományban abszorpciós spektrofotometriával határozzuk meg. Az ultraibolya spektrumban zavaró anyagokat, kalcium-hidroxiddal történő enyhe lúgosítást követően, szárazra párlással távolítjuk el. A 20 mg/l-nél kisebb szorbinsav-koncentrációk igazolásához vékonyréteg-kromatográfiát használunk (érzékenység 1 mg/l).

1.2. **Meghatározás gázkromatográfiával**

A dietil-éterrel kivont szorbinsavat gázkromatográfiával határozzuk meg belső standard jelenlétében.

1.3. **A szorbinsavnyomok azonosítása vékonyréteg-kromatográfiával**

A dietil-éterrel kivont szorbinsavat vékonyréteg-kromatográfiával mutatjuk ki, és koncentrációját félkvantitatív módon határozzuk meg.

2. MEGHATÁROZÁS ULTRAIBOLYA-ABSZORPCIÓS SPEKTROFOTOMETRIÁVAL

2.1. **Reagensok**

2.1.1. Kristályos borkősav ($C_4H_6O_6$).

2.1.2. Kb. 0,02 M kalcium-hidroxid $Ca(OH)_2$ oldat.

2.1.3. 20 mg/l szorbinsav referenciaoldat.

Oldjunk fel 20 mg szorbinsavat ($C_6H_8O_2$) kb. 2 ml 0,1 M nátrium-hidroxid-oldatban. Öntsük egy 1 000 ml-es mérőlombikba, és töltsük fel desztillált vízzel a jelig, vagy 26,8 mg kálium-szorbátot ($C_6H_7KO_2$) oldunk fel vízben, és feltöltjük 1 000 ml-re.

2.2. **Eszközök**

2.2.1. Vízgőzdesztillációs készülék (lásd az „illósavak”-ról szóló fejezetet).

2.2.2. Vízfürdő 100 °C hőmérsékleten.

2.2.3. Spektrofotométer, amely lehetővé teszi a méréseket 256 nm-es hullámhosszon az 1 cm fényúttal rendelkező kvarc küvettában.

2.3. **Eljárás**2.3.1. *Desztilláció*

Töltsünk a vízgőzdesztillációs készülék lombikjába 10 ml bort, és adjunk hozzá 1–2 g borkősavat (2.1.1.). Gyűjtsünk össze 250 ml desztillátumot.

2.3.2. *A kalibrációs görbe elkészítése*

A szorbinsav-referenciaoldat (2.1.3. pont) hígításával készítsünk négy hígított referenciaoldatot, mely, 0,5 - 1 - 2,5 és 5 mg/l szorbinsavat tartalmaz. Mérjük meg az oldatok abszorbanciáit a spektrofotométerrel 256 nm-en, vakpróbaként desztillált vizet használva. Készítsük el a kalibrációs görbét, amely az abszorbancia változását mutatja a koncentráció függvényében. A változás lineáris.

2.3.3. *Meghatározás*

Öntsünk 5 ml desztillátumot egy 55 mm átmérőjű lepárló edénybe, és adjunk hozzá 1 ml kalcium-hidroxid-oldatot (2.1.2. pont). Pároljuk az oldatot vízfürdőn szárazra.

Oldjuk fel a maradékot néhány ml desztillált vízben, vigyük át az oldatot egy 20 ml-es mérőlombikba, és töltsük fel jelig. Mérjük meg az abszorbanciát 256 nm-en a spektrofotométer segítségével egy olyan vakpróbával szemben, amely 1 ml kalcium-hidroxid-oldat (2.1.2. pont) vízzel 20 ml-re történő felhígításával készült.

A mért abszorbanciaérték alapján az oldatban lévő szorbinsav C-koncentrációját a kalibrációs görbe alapján kapjuk meg.

Megjegyzés: Rutin analízisnél elhagyhatjuk a szárazra párlást. Az ultraibolya tartomány mérését közvetlenül a desztillált vízzel 1:4 arányban hígított desztillátumból végezzük.

2.4. Az eredmények megadása

2.4.1. Számítási mód

A borban lévő szorbinsav-koncentrációt mg/l-ben

$100 \times C$ adja

ahol C a szorbinsav koncentrációja a spektrofotometriásan analizált oldatban mg/l-ben.

3. MEGHATÁROZÁS GÁZKROMATOGRÁFIÁVAL

3.1. Reagenszek

3.1.1. Etiléter, (C₂H₅)₂O közvetlenül a felhasználás előtt desztillálva.

3.1.2. Belső referenciaoldat: 1 g/l undekánsav, C₁₁H₂₂O₂ -oldat 95 %-os etil-alkoholban.

3.1.3. 1:3 V/V hígítású kénsav, H₂SO₄ (ρ₂₀ = 1,84 g/ml) oldat.

3.2. Eszközök

3.2.1. Gázkromatográf lángionizációs detektorral és rozsdamentes oszloppal felszerelve (4 m × 1/2"), előzetesen dimetil-diklór-szilánnal (DMDCS) kezelt 80-100 mesh szemcsenagyságú Gaschrom Q, amelyre dietilén-glikol-szukcinát (5 %-os) és foszforsav (1 %) (DEGS- H₃PO₄) elegyét vagy dietilén-glikol-adipát (7 %) és foszforsav (1 %) (DEGA — H₃PO₄) elegyét, mint álló fázist vittek fel.

Az oszlop kezelése DMDCS-nal: áramoltassunk át az oszlopon 2–3 g DMDCS tartalmú toluol oldatot. Azonnal mossuk át metil-alkohollal, majd nitrogénnel, és ezután mossuk át hexánnal, amelyet további nitrogén követ. Ezután feltöltésre készen áll.

Működtetés körülményei:

Kemencehőmérséklet: 175 °C.

Az injektor és a detektor hőmérséklete: 230 °C.

Vivőgáz: nitrogén (áramlási sebesség = 20 ml/perc).

3.2.2. 10 µl-es mikrofecskendő 0,1 µl-es beosztással.

Megjegyzés: Más típusú oszlopok is használhatók, amelyek jó elválasztást adnak, különösen a kapillárisoszlopok (pl. FFAP).

Az alább bemutatott eljárás csak példa.

3.3. Eljárás

3.3.1. Az analizálandó minta előkészítése

Egy csiszolatos üveg dugóval ellátott kb. 40 ml-es üvegcémsőbe öntsünk 20 ml bort, adjunk hozzá 2 ml-es belső standard oldatot (3.1.2. pont) és 1 ml hígított kénsavat (3.1.3. pont).

Miután az oldatot a cső többszöri felfordításával megkevertük, adjunk hozzá 10 ml etilért (3.1.1. pont). Extraháljuk a szerves fázisban lévő szorbinsavat a cső öt percig tartó rázásával. Hagyjuk leülepedni.

3.3.2. A referenciaoldat előkészítése

Válasszunk ki egy olyan bort, amelynél az éterextraktum kromatogramja nem tartalmaz a szorbinsavnak megfelelő csúcsot. Adjunk hozzá 100 mg/l koncentrációjú szorbinsavat. Kezeljük az így előkészített minta 20 ml-jét a 3.3.1. pontban leírt eljárás szerint.

3.3.3. Kromatográfia

Mikrofecskendő segítségével injektáljunk a kromatográfba egymás után 2 µl-t a 3.3.2. pontban leírtak szerint nyert éterextraktum fázisból és 2 µl-t a 3.3.1. pontban leírtak szerint nyert éterextraktum-fázisból.

Regisztráljuk a megfelelő kromatogramokat: azonosítsuk a szorbinsav és a belső standardot a retenciók alapján. Mérjük meg mindkét regisztrált csúcs magasságát (vagy területét).

3.4. Az eredmények megadása

3.4.1. Számítási mód

Az elemzett bor szorbinsavtartalmát mg/l-ben az alábbi képlet adja meg:

$$100 \times (h/H) \times (l/i)$$

H = a szorbinsav csúcsmagassága a referenciaoldatban

h = a szorbinsav csúcsmagassága az analizált mintában

l = a belső standard csúcsmagassága a referenciaoldatban

i = a belső standard csúcsmagassága az analizált mintában

Megjegyzés: A szorbinsavtartalom ugyanilyen módon meghatározható a megfelelő csúcsterületek mérésével.

15 PH (OIV-AS-313-15-PH) – I. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó folyadékba merített két elektród közötti feszültségkülönbséget mérjük. A két elektród egyikének olyan feszültsége van, amely a folyadék pH-értékétől függ, míg a másik elektród, mint referenciaelektróda állandó és ismert feszültséggel rendelkezik.

2. ESZKÖZÖK

2.1. pH mérő, amely pH egységekben van kalibrálva, és lehetővé teszi a méréseket legalább ± 0,05 pH egység pontossággal.

2.2. Elektródák:

2.2.1. Üveg elektród, desztillált vízben tárolva.

2.2.2. Referencia elektród (Kalomel-telített kálium-klorid elektród), telített kálium-klorid-oldatban tárolva.

2.2.3. Kombinált elektród, desztillált vízben tárolva.

3. REAGENSEK

3.1. Pufferoldatok

3.1.1. Kálium-hidrogén-tartarát telített oldata, amely legalább 5,7 g kálium-hidrogén-tartarátot tartalmaz literenként ($C_4H_5KO_6$) 20 °C hőmérsékleten. (Ez az oldat esetleg két hónapig is eltartható, ha 200 ml oldatba 0,1 g timolt teszünk.)

pH	{	3,57 20 °C hőmérsékleten
		3,56 25 °C hőmérsékleten
		3,55 30 °C hőmérsékleten

3.1.2. Kálium-hidrogén-ftalát-oldat 0,05 M, literenként 10,211 g kálium-hidrogén-ftalát-tartalommal ($C_8H_5KO_4$) 20 °C hőmérsékleten. (Maximális eltarthatósági idő két hónap.)

pH	{	3,999 15 °C hőmérsékleten
		4,003 20 °C hőmérsékleten
		4,008 25 °C hőmérsékleten
		4,015 30 °C hőmérsékleten

3.1.3. Oldat, amely az alábbiakat tartalmazza:

kálium-dihidrogén-foszfát, KH_2PO_4	3,402 g
dikálium-hidrogén-foszfát, K_2HPO_4	4,354 g
víz	1 000 m- l-ig

(maximális eltarthatósági idő két hónap)

pH	{	6,90 15 °C hőmérsékleten
		6,88 20 °C hőmérsékleten
		6,86 25 °C hőmérsékleten
		6,85 30 °C hőmérsékleten

Megjegyzés: Kereskedelmi forgalomban kapható referencia-pufferoldatok szintén használhatók.

4. ELJÁRÁS
- 4.1. **Az analizálandó minta előkészítése**
- 4.1.1. *Must és bor esetében:*

használjuk a mustot vagy bort közvetlenül.
- 4.1.2. *Finomított mustsűrítmény esetében:*

hígítsuk a finomított mustsűrítményt vízzel, hogy $25 \pm 0,5$ % (m/m) összcukortartalmat érjünk el (25 ° Brix).
Ha az összes cukortartalom a finomított mustsűrítményben % (m/m)-ban kifejezve P, mérjük le 2 500/P mustsűrítményt, és egészítsük ki 100 g-ra desztillált vízzel. A felhasznált víz vezetőképességének 2 microsiemens/cm-nél kisebbnek kell lennie.
- 4.2. **A készülék nullázása**

Minden mérés előtt nullázzuk a pH mérőt az alkalmazott készülék használati utasítása szerint.
- 4.3. **A pH-mérő kalibrálása**

Kalibráljuk a pH-mérőt 20 °C hőmérsékleten 6,88 és 3,57 pH-jú, 20 °C hőmérsékletű pufferoldat felhasználásával.
Használjunk 4,00 pH-jú, 20 °C hőmérsékletű pufferoldatot a skála kalibrálásának ellenőrzésére.
- 4.4. **Mérés**

Merítsük az elektródát az analizálandó mintába, amelynek hőmérséklete legyen 20 és 25 °C között, a 20 °C-hoz lehető legközelebb. Olvassuk le a pH-értéket közvetlenül a skáláról.
Legalább két meghatározást végezzünk el ugyanazon a mintán.
A végeredményt a meghatározások számtani átlagából kapjuk.
5. **AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA**

A must, a bor vagy a finomított mustsűrítmény 25 % (m/m)-os (25° Brix) oldatának pH-értékét két tizedes pontossággal kell megadni.

16 L- ASZKORBINSAV ÉS D-IZO-ASZKORBINSAV EGYIDŐBEN TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA HPLC-ELJÁRÁSSAL ÉS UV-DETEKTÁLÁSSAL (OIV-AS-313-22-ACASCO) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER**1. BEVEZETÉS**

Az aszkorbinsav egy sor élelmiszerben természetes módon jelenlevő antioxidáns. Az aszkorbinsav szőlőben található normális mennyisége lecsökken a must- és a borkészítés során. Korlátozott mennyiségben adagolható a musthoz és a borhoz.

Az itt leírt módszer érvényességét laboratóriumközi kísérletek keretében, olyan borminták elemzésével igazolták, amelyekhez 30 mg/l-150 mg/l L-aszkorbinsavat és 10 mg/l-100 mg/l D-izo-aszkorbinsavat adtak hozzá.

2. ALKALMAZÁSI TERÜLET

Ez a módszer alkalmas a borban található L-aszkorbinsav és D-izo-aszkorbinsav (eritorbinsav) egyidejű, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás módszerrel és UV-detektálással 3-150 mg/l tartományban történő meghatározására.

Mindkét anyag 150 mg/l-nél magasabb koncentrációja esetén hígítani kell a mintát.

3. A MÓDSZER ELVE

A mintákat, miután előzetesen átszűrték membránszűrőn, közvetlenül befecskendezik a HPLC-rendszerbe. Az analitokat fordított fázisú oszlopon elválasztják és 266 nm-es hullámhosszú UV-detektálásnak vetik alá. Az L-aszkorbinsav és a D-izo-aszkorbinsav mennyiségi meghatározására külső standard alapján kerül sor.

Megjegyzés: Az oszlopok és a működtetési feltételek csak példaként szolgálnak. Más típusú oszlopok is biztosíthatnak jó elválasztást.

4. REAGENSEK ÉS TERMÉKEK**4.1 Reagensek**

- 4.1.1 minimum 99,0 %-os tisztaságú n-oktilamin
- 4.1.2 minimum 99,0 %-os tisztaságú nátrium-acetát x 3 H₂O
- 4.1.3 100 %-os tisztaságú ecetsav
- 4.1.4 kb. 25 %-os foszforsav
- 4.1.5 minimum 99,0 %-os tisztaságú oxálsav
- 4.1.6 aszkorbát oxidáz
- 4.1.7 minimum 99,5 %-os ultratisztaságú L-aszkorbinsav
- 4.1.8 minimum 99,0 %-os tisztaságú D-izo-aszkorbinsav
- 4.1.9 Kétszer desztillált víz
- 4.1.10 99,8 %-os analitikai tisztaságú metanol

4.2 A mozgó fázis előkészítése:**4.2.1 Oldatok a mozgó fázisoz:**

Készítsük el a következő oldatokat a mozgó fázisoz:

- 4.2.1.1 12,93 g n-oktilamin 100 ml metanolban
- 4.2.1.2 68,05 g nátrium-acetát x 3 H₂O 500 ml kétszeresen desztillált vízben
- 4.2.1.3 12,01 g tiszta ecetsav 200 ml kétszeresen desztillált vízben
- 4.2.1.4 Pufferoldat (pH 5,4): 430 ml nátrium-acetát oldat (4.2.1.2) és 70 ml ecetsavoldat (4.2.1.3)

4.2.2 A mozgó fázis előkészítése:

Főzőpohárban adjunk hozzá 5 ml n-oktilamin oldatot (4.2.1.1) körülbelül 400 ml kétszeresen desztillált vízhez. 25 %-os foszforsav (4.1.4) cseppenkénti hozzáadásával, állítsuk be az oldat pH-ját 5,4-ről 5,6-ra. Adjunk hozzá 50 ml-t a pufferoldatból (4.2.1.4) és öntsük át a vegyületet egy 1 000 ml-es mérőlombikba, majd töltsük fel kétszeresen desztillált vízzel. A mozgó fázist használat előtt (0,2 µm-es regenerált cellulóz) membrán segítségével át kell szűrni és amennyiben lehetséges héliummal (körülbelül 10 percen keresztül) gáztalanítani kell a használt HPLC-rendszer szükségletei szerint.

4.3 A standard oldat előkészítése

Megjegyzés:

Minden standard oldatot (törzsoldat - 4.3.1. pont és munkaoldatok – 4.3.2. pont) minden nap el kell készíteni és lehetőleg hűtőben kell tárolni az injektálás előtt.

4.3.1 A törzsoldat elkészítése (1 mg/ml)

Készítsük el az oxálsav 2 %-os vizes oldatát és nitrogén buborékolatásával távolítsuk el az oldott oxigént.

Egy 100 ml-es mérőlombikba mérjünk be pontosan 100 mg L-aszkorbinsavat és 100 mg D-izo-aszkorbinsavat és töltsük fel 2 %-os vizes oxálsav oldattal.

4.3.2 A munkaoldatok előkészítése

A munkaoldatok elkészítéséhez hígítsuk fel a törzsoldatot (4.3.1) a kívánt koncentráció elérésig 2 %-os vizes oxálsav oldattal. 10 mg/l és 120 mg/l közötti koncentráció ajánlott. Például 100 µl, 200 µl, 400 µl, 800 µl 1 200 µl 10 ml-ig, mely 10, 20, 40, 80 és 120 mg/l-nek felel meg.

5. ESZKÖZÖK

A szokásos laboratóriumi eszközök, valamint különösen a következők:

5.1 HPLC pumpa

5.2 injektor, 20 µl-es mintahurokkal

5.3 UV-detektor

6. MINTAVÉTEL

A bormintákat 0,2 µm pórusátmérőjű membránon átszűrjük injektálás előtt.

150 mg/l-nél nagyobb tartalmak esetén hígítani kell a mintát.

7. ELJÁRÁS

7.1 A HPLC használatára vonatkozó feltételek

Injektáljunk 20 µl-nyit a membránon átszűrt mintából a kromatográfiás készülékbe.

Előtétoszlop:: példádul nucleosil 120 C18 (4 cm × 4 mm × 7 µm)

Oszlop: példádul nucleosil 120 C18 (25 cm × 4 mm × 7 µm)

Injektálási térfogat: 20 µl

Mozgófázis: lásd 4.2.2, izokratikus

Áramlási sebesség: 1 ml/min

UV-detektálás: 266 nm

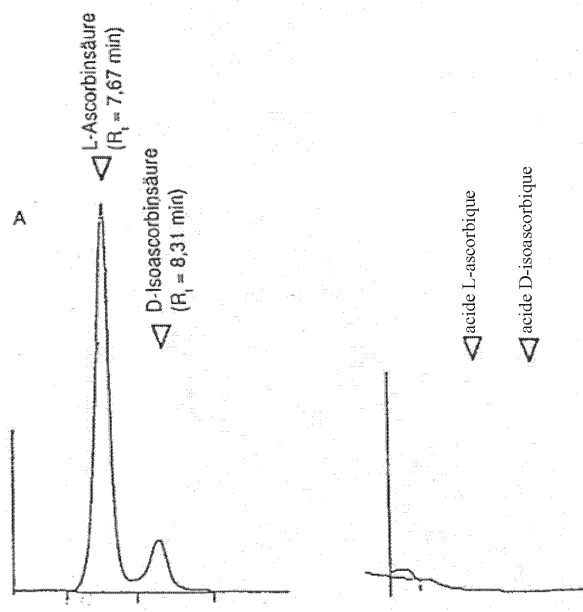
Öblítési ciklus: legalább 30 ml kétszer desztillált víz, majd azt követően 30 ml metanol és 30 ml acetonitril

7.2 Azonosítás/igazolás

A csúcsok meghatározása a standardok és a minták retenciós idejének összehasonlításával történik. A példában leírt kromatográfias rendszerrel a retenciós idő 7,7 perc az L-askorbinsav esetében és 8,3 perc a D-izo-askorbinsav esetében (lásd 1. ábra, A. kromatogram).

A pozitív eredmények igazolására a mintákat egy spatulányi askorbát-oxidázzal kell kezelni és újból meg kell mérni (lásd 1. ábra, B. kromatogram).

Az L-askorbinsav és a D-izo-askorbinsav askorbát oxidáz hatására történő lebomlása miatt, azok jelenlétét retenciós idejük alatt nem kellene érzékelni. Zavaró csúcsok jelentkezése esetén, a csúcsok alatti terleteket figyelembe kell venni az analitikai koncentrációjának kiszámításakor.



1. ábra

Példa fehérbor kromatogramjára: A: askorbát-oxidázzal folytatott kezelés előtt; B: kezelés után

Megjegyzés: Az askorbát-oxidázzal kezelt mintákat az oszlopon található askorbát-oxidáz maradványok eltávolítása céljából öblítési ciklussal lezárt fázis végén ajánlott analizálni, mivel ellenkező esetben az L-askorbinsavat és a D-izo-askorbinsavat a HPLC-mérés során átalakíthatják az askorbát-oxidáz maradványok és ez befolyásolhatja az eredményt.

8. SZÁMÍTÁS

Készítsünk kalibrációs görbét a munkaadatok alapján (4.3.2). A külső standard módszernek megfelelően, az L-askorbinsav és a D-izo-askorbinsav mennyiségi meghatározása a csúcsterületek megmérésével, illetve azoknak a kalibrációs görbén mért megfelelő koncentrációval történő összehasonlítása alapján kerül sor.

Az eredmények megadása

Az eredmények az L-askorbinsav és a D-izo-askorbinsav esetében egy tizedes pontossággal mg/l-ben kerülnek kifejezésre (például 51,3 mg/l).

150 mg/l-nél nagyobb tartalmak esetén, figyelembe kell venni a hígítást.

9. MEGBÍZHATÓSÁG

Az eljárást a volt Köztisztasági Szövetségi Hivatal (Bundesgesundheitsamt, Németország) által 1994-ben szervezett laboratóriumközi kísérlet keretében 27 laboratórium részvételével ellenőrizték. A laboratóriumközi kísérlet programja az élelmiszerekre vonatkozó német törvény 35. §-át követi, amelyet az OIV is elfogadott egészen az új útmutató bevezetéséig.

A vizsgálat négy különböző bormintára terjedt ki (két fehérbor és két vörösbor), a kért minták vizsgálatát ötször ismételték. Mivel megfelelő analitstabilitással (különböző bomlási sebességek), rendelkező minták készítésére nem volt lehetőség, az a döntés született, hogy a résztvevőknek elküldik a tiszta standard anyagok meghatározott mennyiségeit, illetve a bormintákat. A laboratóriumok azt az utasítást kapták, hogy a standard anyagokat veszteség nélkül adják hozzá a bormintákhoz és rögtön kezdjék meg a vizsgálatot. Az L-aszkorbinsav esetében 30-150 mg/l térfogatnyi, a D-izo-aszkorbinsav esetében 10-100 mg/l térfogatnyi mintát vizsgáltak. A vizsgálatokat részletesen az OIV által megjelentetett MELLÉKLET mutatja be. A kiértékelésre a DIN/ISO 5725 szabvány (1988-as verzió) szerint került sor.

Az ismételhetőség (s_r) és a reprodukálhatóság (s_R) standard szórása megfelelt az L-aszkorbinsav és a D-izo-aszkorbinsav koncentrációinak. A valós pontossági paraméter az alábbi egyenletek segítségével számítható ki:

L-aszkorbinsav

$$s_r = 0,011 x + 0,31$$

$$s_R = 0,064 x + 1,39$$

x: L-aszkorbinsav koncentráció (mg/l)

D-izo-aszkorbinsav

$$s_r = 0,014 x + 0,31$$

$$s_R = 0,079 x + 1,29$$

x: D-izo-aszkorbinsav koncentráció (mg/l)

Példa:

50 mg/l D-izo-aszkorbinsav $s_r = 1,0$ mg/l

$$s_R = 5,2 \text{ mg/L}$$

10. AZ ELEMZÉS EGYÉB JELLEMZŐI

10.1 Érzékelési határ

Ennek a módszernek a becsült érzékelési határa az L-aszkorbinsav és a D-izo-aszkorbinsav esetén 3 mg/l.

10.2 Pontosság

A négy mintán végzett laboratóriumi vizsgálat alapján a kalkulált átlagos kinyerési hatások (lásd az OIV kézikönyvében közzétett MELLÉKLET-et) a következők voltak:

— 100,6 % az L-aszkorbinsav esetében

— 103,3 % a D-izo-aszkorbinsav esetében

17 SZÉN-DIOXID (OIV-AS-314-01-DIOCAR) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZER ELVE

1.1. **Csendes borok (szén-dioxid-túlnyomás $\leq 0,5 \times 10^5$ Pa) ⁽¹⁾**

A kb. 0 °C-ra lehűtött bor alikvot részéhez annyi nátrium-hidroxidot adunk, hogy pH-ja 10–11 legyen. A titrálást savoldattal végezzük karboanhidráz jelenlétében. A szén-dioxid-tartalmat abból a savmennyiségből számítjuk, amely ahhoz szükséges, hogy a pH 8,6-ról (bikarbonát) 4,0-ra (szénsav) változzon. Vaktitrálást végzünk ugyanilyen körülmények között a szén-dioxid-mentes borral.

1.2. **Pezsgők és gyöngyözőborok**

Az analizálandó bormintát közel fagypontra hűtjük. Miután egy bizonyos mennyiséget kivettünk vakpróba céljából szénsavmentesítés után, a palackban lévő maradékot lúgosítjuk, hogy az összes szén-dioxidot Na₂CO₃ formájában megkössük. A titrálást savoldattal végezzük karboanhidráz jelenlétében. A szén-dioxid-tartalmat abból a savoldatmennyiségből számítjuk ki, amely ahhoz szükséges, hogy a pH-értéket 8,6-ról (bikarbonát) 4,0-ra (szénsav) változtassa. Vaktitrálást végzünk ugyanilyen körülmények között a szén-dioxid-mentes borral, ami lehetővé teszi a borban található savak által felszívott nátrium-hidroxid-oldat térfogatának megállapítását.

2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

2.1. **Csendes borok (CO₂-túlnyomás $\leq 0,5 \times 10^5$ Pa)**2.1.1. *Eszközök*

2.1.1.1. Mágneses keverő.

2.1.1.2. pH-mérő.

2.1.2. *Reagensek*

2.1.2.1. 0,1 M nátrium-hidroxid oldat, NaOH.

2.1.2.2. 0,05 M kénsavoldat (H₂SO₄).

2.1.2.3. 1 g/l karboanhidráz-oldat.

2.1.3. *Eljárás*

Hűtsük le a bormintát kb. 0 °C-ra a mintavételhez használt 10 ml-es pipettával együtt.

Töltsünk 25 ml nátrium-hidroxid-oldatot (2.1.2.1. pont) egy 100 ml-es főzőpohárba; adjunk hozzá két csepp karboanhidráz vizes oldatot (2.1.2.3. pont). Adjunk hozzá 10 ml bort a 0 °C-ra lehűtött pipettával.

Helyezzük a főzőpoharat a mágneses keverőre, mérítsük az elektródot a vizsgálandó oldatba, és mérsékeltén keverjük.

Amikor a folyadék elérte a szobahőmérsékletet, lassan titráljuk kénsavoldattal (2.1.2.2. pont), amíg a pH eléri a 8,6-ot. Jegyezzük fel a buretta állását.

Folytassuk a titrálást a kénsavval (2.1.2.2. pont), amíg a pH eléri a 4,0-t. Legyen a 8,6 és 4,0 pH között felhasznált térfogat n ml.

Távolítsuk el a szén-dioxidot kb. 50 ml bormintából úgy, hogy a mintát vákuum alatt három percig mozgatjuk, miközben a palackot vízfürdőben kb. 25 °C hőmérsékletre melegítjük.

Végezzük el a fenti eljárást 10 ml szén-dioxid-mentes borral. Legyen n' ml a felhasznált térfogat.

2.1.4. *Az eredmények megadása*

0,05 M kénsav-oldat 1 ml-je megfelel 4,4 mg CO₂-nek.

A CO₂ mennyiségét g/l-ben az alábbi összefüggés adja:

$$0,44 (n - n')$$

Az eredményt két tizedes pontosságig adjuk meg.

Megjegyzés: Ha a bor kevés szén-dioxidot tartalmaz (CO₂ CO₂ < 1 g/l), a CO₂ hidratálásának katalizálásához használt karboanhidráz hozzáadása nem szükséges.

⁽¹⁾ 10⁵ pascal (Pa) = 1 bar.

2.2. **Pezsgők és gyöngyözőborok**

2.2.1. *Eszközök*

2.2.1.1. Mágneses keverő.

2.2.1.2. pH-mérő.

2.2.2. *Reagensek*

2.2.2.1. 50 % (m/m) nátrium-hidroxid (NaOH).

2.2.2.2. 0,05 M kénsavoldat (H₂SO₄).

2.2.2.3. 1 g/l karboanhidráz-oldat.

2.2.3. *Eljárás*

Jelöljük meg a bor szintjét a palackban, majd hűtsük le, amíg fagyni kezd.

Hagyjuk a palackot rázás közben kicsit felmelegedni, amíg a jégkristályok eltűnnek.

Vegyük ki gyorsan a dugót, és töltünk 45–50 ml bort egy mérőhengerbe vaktitrálás céljából. A pontos térfogatot, a *v* ml-t a mérőhengerről akkor olvassuk le, amikor a próba újból elérte a szobahőmérsékletet.

A vakminta kivétele után azonnal adjunk 20 ml nátrium-hidroxid-oldatot (2.2.2.1. pont) egy 750 ml-es palackba.

Várjuk meg, amíg a bor eléri a szobahőmérsékletet.

Töltünk 30 ml kiforralt desztillált vizet és két csepp karboanhidráz-oldatot (2.2.2.3. pont) egy 100 ml-es főzőpohárba. Adjunk hozzá 10 ml lúgosított bort.

Helyezzük a főzőpoharat mágneses keverőre, állítsuk bele az elektródot és a mágneses keverőt, és óvatosan keverjük.

Titráljuk lassan kénsavoldattal (2.1.2.2. pont), amíg a pH eléri a 8,6-t.

Folytassuk a titrálást a kénsavval (2.1.2.2. pont), amíg a pH eléri a 4,0-t. Legyen *n* ml a 8,6 és 4,0 pH között felhasznált térfogat.

Távolítsuk el a CO₂-t a vaktitrálás céljára félretett *v* ml borból úgy, hogy vákuum alatt három percig mozgatjuk, miközben a palackot vízfürdőben kb. 25 °C hőmérsékletre melegítettük. Vegyünk ki 10 ml szén-savmentesített bort, és adjuk 30 ml kiforralt desztillált vízhez, adjunk hozzá két-három csepp nátrium-hidroxid-oldatot (2.2.2.1.), hogy a pH 10–11 legyen. Ezután járjunk el a fent leírtak szerint. Legyen *n'* ml a hozzáadott 0,5 M kénsav térfogata.

2.2.4. *Az eredmények megadása*

1 ml 0,05 M kénsav megfelel 4,4 mg CO₂-nek.

Ürítsük ki a lúgosított bort tartalmazó palackot, és határozzuk meg 1 ml-es pontossággal a kiinduló bortérfogatot úgy, hogy feltöltjük jelig vízzel: *V* ml.

A CO₂ mennyisége g/l-ben az alábbi képlettel határozható meg:

$$0,44(n - n') \times ((V - v + 20)/(V - v))$$

Az eredményt két tizedes pontossáig adjuk meg.

2.3. **Az elméleti túlnyomás kiszámítása**

A túlnyomást 20 °C hőmérsékleten (P_{aph20}) pascalban fejezzük ki az alábbi összefüggés szerint:

$$P_{aph20} = ((Q)/(1,951 \times 10^{-5}(0,86 - 0,01 A)(1 - 0,00144 S))) - Patm$$

ahol:

Q: a bor CO₂-tartalma g/l-ben;

A: a bor alkoholtartalma (% V/V) 20 °C hőmérsékleten;

S: a bor cukortartalma g/l-ben;

Patm: az atmoszférikus nyomás pascalban kifejezve.

18 A BORBAN JELENLÉVŐ SZÉN-DIOXID MANOMETRIKUS MÓDSZERREL TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA
(OIV-AS314-04-CO2MAN) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER

(p.m.)

[Ennek az analitikai módszernek a leírását felülvizsgálják az OIV hatóságai. A leírás egy későbbi bizottsági közleményben kerül közzétételre, mielőtt azt az OIV közzéteszi a „Borok nemzetközi analitikai módszereinek kézikönyve” című kiadványa 2010-es kiadásában.

19 A GYÖNGYÖZŐBOROKBAN ÉS PEZSGÓKBEN KELETKEZŐ TÚLNYOMÁS MÉRÉSE (OIV-AS-314-02-SURPRES) – I. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZER ELVE

A hőmérséklet stabilizálását és a palack felrészését követően a túlnyomást egy afrométer (nyomásmérő) segítségével kell megmérni. A túlnyomást pascalban (Pa) kell kifejezni (I. típusú módszer). A módszer alkalmazható a szénsav hozzáadásával készült pezsgők és gyöngyözőborok esetében is.

2. ESZKÖZÖK

A pezsgős és a gyöngyözőboros palackokban lévő túlnyomás meghatározását lehetővé tévő eszközt afrométernek nevezzük. A palack zárásától (fémkupak, söröskupak, parafa vagy műanyag dugó) függően különböző változatai léteznek.

2.1. Afrométer kupakkal ellátott palackokhoz

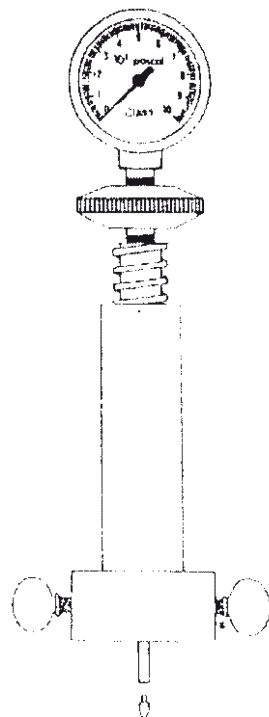
Az afrométer három részből áll (1. ábra):

- A felső rész (azaz a csavaros szűrőszár) a manométerből, egy kézi szorítógyűrűből, egy, a középső részbe csúsztató végtelen csavartól és a kupakon áthatoló tűből áll. A tű oldalán egy lyuk található, amely a nyomást a manométer felé közvetíti. Egy tömítőgyűrű biztosítja, hogy a készülék légmentesen illeszkedjen a palack kupakjához.
- A középső rész (azaz az anyacsavar) a felső rész középre igazítására szolgál. Az alsó részbe kell beleszarni, ezáltal rögzítve szilárdan a készüléket a palackra.
- Az alsó rész (avagy a szorítóbilincs) egy sarkantyúszerű kiálló résszel van ellátva, amely a palack pereme alá csúszik, így tartva meg a műszert a palackon. Léteznek olyan peremgyűrűk, amelyek minden palacktípushoz alkalmazhatóak.

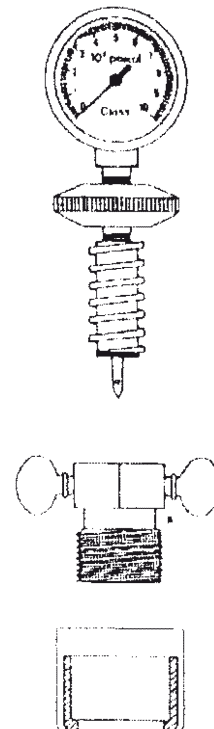
2.2. Afrométer dugóval ellátott palackokhoz

Az afrométer két részből áll (2. ábra):

- A felső rész megegyezik az előző készülékkel; a tű azonban hosszabb. Ez utóbbi egy hosszú, üres csőből áll, amelynek végén egy hegyes csúcs található, amely a tűnek a dugón való áthatolását segíti. Ez a csúcs eltávolítható, és amint a dugón áthaladt, belesik a borba.
- Az alsó részt az anyacsavar és egy, a dugóra illeszkedő alap alkotja. Ez négy szorítócsavarral van felszerelve, amelyek a készüléknek a palackon történő rögzítésére szolgálnak.



2. ábra: Afrométer parafa és egyéb dugókhöz



1. ábra: Afrométer kupakokhoz

Megjegyzések az e két típushoz tartozó készülékekben található manométerekhez:

- Ezek lehetnek mechanikus, a Bourdon-cső elvén működő manométerek, vagy pedig numerikus, piezoelektromos érzékelőberendezéssel ellátott manométerek. Az első esetben a Bourdon-csőnek kötelezően rozsdamentes acélból kell készülnie.
- A manométerek beosztása pascalban van megadva (rövidítés: Pa). A pezsgők esetében célszerűbb 10^5 pascalt (10^5 Pa) vagy kilopascalt (kPa) egységként választani.
- A manométerek különböző osztályokba tartozhatnak. A manométer osztályát a leolvasás pontosságának a teljes skálához viszonyított, százalékban kifejezett értéke határozza meg (pl. egy 1. minőségi osztályú, 1 000 kPa-os manométer esetében a maximális alkalmazható nyomás 1 000 kPa, ± 10 kPa-os leolvasási pontossággal). A pontos méréshez 1. osztályú műszer ajánlott.

3. ELJÁRÁS

A mérést olyan palackokon kell elvégezni, amelyek hőmérsékletét legalább 24 órán keresztül stabilizálták. A kupak, a parafa vagy műanyag dugó átszúrása után a palackot erőteljesen rázni kell a nyomás állandóvá válásáig, hogy elvégezhesük a leolvasást.

3.1. Kupakos palackok

Csúsztassuk a szorítóbilincs sarkantyúszerű kiálló részét a palack pereme alá. Csavarjuk rá az anyacsavart úgy, hogy a készülék rendesen rá legyen erősítve a palackra. Ezután csavarozzuk bele a felső részt az anyacsavarba. A gázszőkés megakadályozása érdekében a kupak átszúrását a lehető leggyorsabban kell elvégezni, hogy a tömítőgyűrű mielőbb érintkezésbe kerüljön a kupakkal. Ezután a palackot erőteljesen rázni kell a nyomás állandóvá válásáig, hogy elvégezhesük a leolvasást.

3.2. Dugós palackok

Illesszünk egy hegyes csúcsot a tű végére. Helyezzük el az összeszerelt készüléket a dugón. Szorítsuk rá a négy csavart a dugóra. Csavarjuk be a felső részt (ekkor a tű áthatol a dugón). A csúcsnak bele kell esnie a palackba ahhoz, hogy a nyomás eljusson a manométerhez. A palackot a nyomás állandóvá válásáig rázzuk, majd végezzük el a leolvasást. A leolvasás után vegyük ki a csúcsot.

4. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

A túlnyomást 20 °C -os hőmérsékleten ($P_{\text{aph}20}$) pascalban (Pa) vagy kilopascalban (kPa) fejezzük ki. Ennek az értéknek összhangban kell lennie a manométer pontosságával (például $6,3 \times 10^5$ Pa vagy 630 kPa, nem pedig $6,33 \times 10^5$ Pa vagy 633 kPa egy 1 000 kPa-ig mérő 1. osztályú manométer esetében).

Ha a hőmérséklet, amelyen a mérést végezzük, 20 °C -tól eltérő, korrekciót kell alkalmazni úgy, hogy a mért nyomást megszorozzuk a megfelelő együtthatóval (lásd az 1. táblázatot).

1. Táblázat

A gyöngyözőborban vagy a pezsgőben 20 °C -on mért $P_{\text{aph}20}$ túlnyomásnak a t hőmérsékleten mért $P_{\text{aph}t}$ túlnyomáshoz viszonyított aránya

°C		°C	
0	1,85	13	1,24
1	1,80	14	1,20
2	1,74	15	1,16
3	1,68	16	1,13
4	1,64	17	1,09
5	1,59	18	1,06
6	1,54	19	1,03
7	1,50	20	1,00
8	1,45	21	0,97
9	1,40	22	0,95
10	1,36	23	0,93
11	1,32	24	0,91
12	1,28	25	0,88

5. AZ EREDMÉNYEK ELLENŐRZÉSE

A fizikai paraméterek közvetlen meghatározásának módszere (I. típusú kritériummódszer)

Az afrométerek ellenőrzése

Az afrométereket rendszeresen ellenőrizni kell (legalább évente egyszer).

Az ellenőrzést egy kalibrációs pad segítségével kell elvégezni. Ez lehetővé teszi a vizsgálandó manométer összehasonlítását egy magasabb osztályú, nemzeti szabványoknak megfelelően összeállított, párhuzamosan felszerelt referencia-manométerrel. Az ellenőrzés a két műszer által mutatott, emelkedő és csökkenő nyomásértékek összevetésére szolgál. Amennyiben a két műszer által mutatott értékek különböznek, egy szabályozó-csavar segítségével elvégezhetők a szükséges korrekciók.

Valamennyi laboratórium és engedéllyel rendelkező szervezet fel van szerelve ilyen kalibrációs padokkal; ezeket be lehet továbbá szerezni a manométerek gyártóitól is.

20 A BORBAN JELEN LÉVŐ LIZOZIM MEGHATÁROZÁSA HPLC-ELJÁRÁSSAL (OIV-AS-315-14) – IV. TÍPUSÚ MÓDSZER**1. BEVEZETÉS**

A lizozim meghatározására célszerűbb egy olyan analitikai módszert választani, amely nem alapul enzimaktivitáson.

2. ALKALMAZÁSI KÖR

Ez a módszer lehetővé teszi a fehérborokban és a vörösborokban jelen lévő lizozim mennyiségi (mg fehérje/l) meghatározását függetlenül a mátrix enzimaktivitásától (amelyet befolyásolhatnának a részleges denaturálás vagy a komplexképzési és az együttes kicsapódási jelenségek).

3. FOGALOMMEGHATÁROZÁS

A nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) olyan analitikai megközelítést nyújt, amely az álló fázis és az analít közötti szterikus, poláros vagy adszorpciós kölcsönhatáson alapul és így nem függ a fehérje valós enzimaktivitásától.

4. A MÓDSZER ELVE

Az analízist nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) spektrofometriás és spektrofluorometriás detektor segítségével végzik. A borminta ismeretlen tartalma a külső kalibrálási metodológia felhasználásával a kromatográfias csúcsterületnek megfelelően kerül kiszámításra.

5. REAGENSEK**5.1. Oldószerek és oldatok**

acetonitril (CH_3CN) a HPLC-analízishez

tiszta trifluor-ecetsav (TFA)

ioncserélt víz a HPLC-analízishez

Standard oldat: 1 g/l borkősav, semleges kálium-tartarátal 3,2-re beállított pH értékű 10 % (v/v)-os etil-alkohol

5.2. Eluensek

A: CH_3CN 1 %, TFA 0,2 %, H_2O = 98,8 %

B: CH_3CN 70 %, TFA 0,2 %, H_2O = 29,8 %

5.3. Referenciaoldatok

1-250 mg/l standard lizozim a mátrixoldatban feloldva minimum 12 órán át tartó folyamatos rázással.

6. ESZKÖZÖK

6.1. Eluálási gradiens meghatározására szolgáló, szivattyúrendszerrel ellátott HPLC-készülék

6.2. termosztált oszlop háza (kemence)

6.3. spektrofluorometriás detektorral társított spektrofometriás detektor

6.4. Injektáló hurok, 20 μL

6.5. Fordított fázisú polimer oszlop fenil funkciócsoportokkal (pórusok átmérője = 1 000 Å, kizárási határ = 1 000 000 Da), például Tosoh Bioscience TSK-gel Phényl 5 PW RP 7,5 cm x 4,6 mm ID

6.6. Előtéoszlop ugyanabból az anyagból, mint az oszlop, például Tosoh Bioscience TSK-gel Phényl 5 PW RP Guardgel 1,5 cm x 3,2 mm ID

7. A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

A bormintákat 1:10 arányban hígított HCL-dal (10 M) savanyítjuk és átszűrjük 0,22 μm pórusátmérőjű poli-amidszűrőn, 5 perccel a hozzáadást követően. A kromatográfias analízist rögtön a szűrés után elvégezzük.

8. MŰKÖDTETÉSI KÖRÜLMÉNYEK

8.1. Eluens áramlási sebessége: 1 ml/perc

8.2. Oszlophőmérséklet: 30 °C

- 8.3. Spektrofotometriás detektálás: 280 nm
- 8.4. Spektrofluorometriás detektálás: $\lambda_{ex} = 276 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$; Sűrítés = 10
- 8.5. Eluálási grádiens-program

Idő (perc)	A- oldat %	B- oldat %	gradiens
0	100	0	
			izokratikus
3	100	0	
			lineáris
10	65	35	
			izokratikus
15	65	35	
			lineáris
27	40,5	59,5	
			lineáris
29	0	100	
			izokratikus
34	0	100	
			lineáris
36	100	0	
			izokratikus
40	100	0	

- 8.6. a lizozim átlagos retenciós ideje: 25,50 perc

9. SZÁMÍTÁS

A következő lizozim-koncentrációkat tartalmazó referenciaoldatokat háromszor analizálják: 1; 5; 10; 50; 100; 200; 250 mg/l. Az egyes kromatogramokon a lizozimnak megfelelő csúcsterületeket koncentrációjuknak megfelelően egy diagramon jelöljük annak érdekében, hogy megkapjuk az $Y = ax+b$ képlettel kifejezett lineáris regressziós egyeneseket. A determinációs együtthatónak r^2 többnek kell lennie 0,999-nél.

10. A MÓDSZER JELLEMZŐI

Annak felmérésére, hogy a módszer megfelel-e a meghatározott célnak, a linearitás, a érzékelési határok (ÉH), a mennyiségmeghatározási határok (MH) és a módszer pontossága figyelembevételével hitelesítési vizsgálatra került sor. A módszer pontosságát a módszer pontossági és hitelességi szintjének megállapításával mérik.

	Linearitási tartomány (mg/l)	Az egyes meredeksége	Determinációs együttható (r^2)	ÉH (mg/l)	MH (mg/l)	Ismételhetőség (n=5) RSD%			Reprodukálhatóság (n=5) RSD%
						So ¹	VB	FB	So ¹
UV	5-250	3,786	0,9993	1,86	6,20	4,67	5,54	0,62	1,93
FLD	1-250	52,037	0,9990	0,18	0,59	2,61	2,37	0,68	2,30

1. táblázat: A módszer jellemzőivel kapcsolatos adatok: So¹: standard oldat; VB²: vörösbor; FB³: fehérbor

10.1. A módszer linearitása

A lineáris regressziós analízis révén kapott eredmények alapján a módszer lineárisnak bizonyult az 1. táblázatban feltüntetett tartományok tekintetében.

10.2. Érzékelési határ és mennyiségmeghatározási határ

A érzékelési határ (ÉH) és a mennyiségmeghatározási határ (MH) kiszámításakor a ÉH esetében a munkavégzés közbeni kromatográfias háttérzaj értékének háromszorosát, míg az MH esetében a háttérzaj értékének tízszeresét vették figyelembe valós mátrixon (1. táblázat).

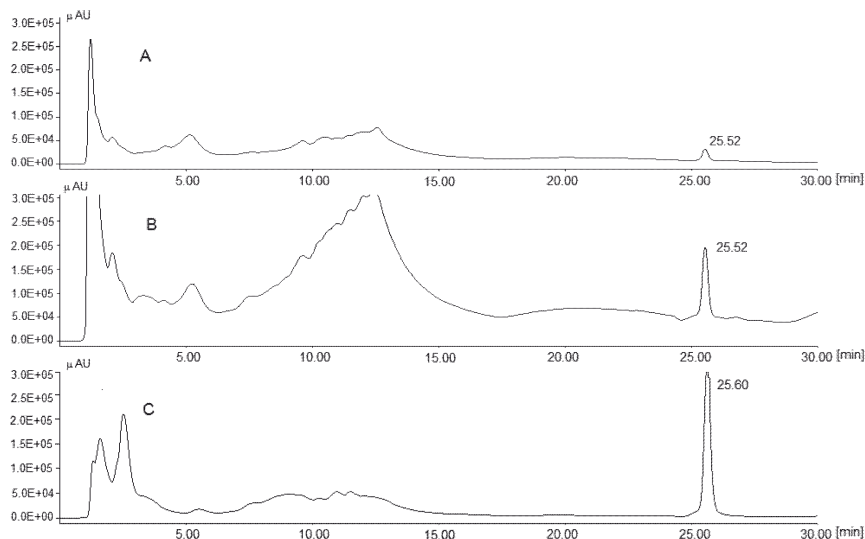
10.3. A módszer pontossága

A módszer pontosságának mérésénél az ismételhetőségi és a reprodukálhatósági paramétereket vették figyelembe. Az 1. táblázat tartalmazza e paraméterek standard oldatra, fehérborra és vörösborra vonatkoztatott értékeit (különböző koncentrációkkal megismételt mérések standard eltéréseinek %-os arányában kifejezve).

10.4. A módszer pontossága

A visszanyerési arányt 5 és 50 mg/l lizozimot tartalmazó standard oldatokon mérték, melyekhez az alábbi táblázatban meghatározottak szerinti, adott mennyiségű lizozimot adtak.

	Kiindulási névleges koncentráció [C] (mg/l)	Hozzáadott mennyiség (mg/l)	Elméleti koncentráció [C] (mg/l)	Mért koncentráció [C] (mg/l)	Standard eltérés	Visszanyerési arány %
UV 280 nm	50	13,1	63,1	62,3	3,86	99
FD	50	13,1	63,1	64,5	5,36	102
UV 280 nm	5	14,4	19,4	17,9	1,49	92,1
FD	5	14,4	19,4	19,0	1,61	97,7



1. ábra: Tiszta lizozimot tartalmazó vörösbor kromatogramja (a borhoz 1 000 mg/l lizozimot tartalmazó standard oldatot adva 125 mg/l végleges lizozimkoncentrációt kaptunk). A: 280 nm hullámhosszú UV-detektor B: 225 nm hullámhosszú UV-detektor C: FLD-detektor (λ ex 276 nm; λ em 345 nm).

21 SZULFÁT (OIV- AS-321-05-SULFAT) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZEREK ELVE
- 1.1. **Referencia-módszer**

Bárium-szulfát leválasztása és annak gravimetriás mérése. Az ugyanilyen körülmények között leválasztott bárium-foszfat a csapadék sósavval történő mosásával távolítható el.

Nagy mennyiségű kén-dioxidot tartalmazó mustok vagy borok esetében javasolt a szulfitokat előzetesen a levegő kizárása mellett történő forralással eltávolítani.
- 1.2. **Gyors vizsgálati módszer**

A borok különböző kategóriákba sorolhatók az úgynevezett határérték módszerrel, ami a szulfátnak ismert mennyiségű bárium-klorid-oldattal bárium-szulfátként történő leválasztásán alapul.
2. REFERENCIA-MÓDSZER
- 2.1. **Reagensek**
- 2.1.1. 2 M sósav oldat.
- 2.1.2. 200 g/l bárium-klorid oldat ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- 2.2. **Eljárás**
- 2.2.1. *Általános eljárás*

Mérjük 40 ml vizsgálandó mintát egy 50 ml-es centrifugacsőbe, adjunk hozzá 2 ml 2 M sósavat és 2 ml 200 g/l bárium-klorid-oldatot. Keverjük össze üvegbottal; öblítsük le az üvegbotot egy kevés desztillált vízzel, és hagyjuk állni az oldatot öt percig. Centrifugáljuk öt percig, majd óvatosan öntsük le a folyadék tisztáját.

Ezután mossuk a bárium-szulfát-csapadékot a következők szerint: adjunk hozzá 10 ml 2 M sósavat, rázzuk fel a csapadékot, és centrifugáljuk öt percig, majd óvatosan öntsük le a folyadék tisztáját. Ismételjük meg a mosást kétszer ugyanolyan körülmények között, minden alkalommal 15 ml desztillált vizet használva.

Mossuk át az egész csapadékmennyiséget desztillált vízzel öblítve egy lemért platinacsészébe, és 100 °C hőmérsékletű vízfürdőben pároljuk szárazra. A száraz csapadékot többször röviden nyílt láng fölött izzítjuk mindaddig, amíg fehér maradékot nem kapunk. Exsikkátorba tesszük, és kihűlés után mérjük.

Legyen m = az így kapott bárium-szulfát tömege milligrammban.
- 2.2.2. *Különleges eljárás: magas kén-dioxid-tartalmú must és bor esetében.*

Először távolítsuk el a kén-dioxidot.

Mérjük 25 ml vizet és 1 ml tiszta sósavat ($\rho_{20} = 1,15 - 1,18$ g/ml) 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba, amely csepegtető tölcserrel és kivezető csővel van ellátva. Forraljuk az oldatot, hogy a levegő eltávozzon, és juttassunk bele 100 ml bort a csepegtető tölcseren keresztül. Folytassuk a forralást, amíg a lombikban lévő folyadék térfogata kb. 75 ml-re csökken, és a teljes mennyiséget hűtés után vigyük át 100 ml-es mérőlombikba. Töltsük fel vízzel jelig. Határozzuk meg a szulfáttartalmat a mintaoldat 40 ml-éből a 2.2.1. szakaszban leírtak szerint.
- 2.3. **Az eredmények megadása**
- 2.3.1. *Számítás*

A szulfáttartalom mg/l kálium-szulfátban kifejezve:

$$18,67 \times m$$

A mustban vagy borban lévő szulfáttartalmat egész számra kerekítve mg/l kálium-szulfátban, K_2SO_4 adjuk meg.
- 2.3.2. *Ismételhetőség*

1 000 mg/l-ig: $r = 27$ mg/l
1 500 mg/l körül: $r = 41$ mg/l
- 2.3.3. *Reprodukálhatóság*

1 000 mg/l-ig: $R = 51$ mg/l
1 500 mg/l körül: $R = 81$ mg/l

22 VAS (OIV-AS-322-05-FER) – IV. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZEREK ELVE

REFERENCIA-MÓDSZER

A bor alkoholtartalmának eltávolítása és megfelelő hígítása után a vasat közvetlenül atomabszorpciós spektrofotometriával határozzuk meg.

SZOKÁSOS MÓDSZER

30 %-os hidrogén-peroxid-oldattal történő feltárást követően az összes vastartalom ekkor Fe(III) állapotból Fe(II) állapotba redukálódik és a fenantrolin által okozott piros elszíneződést használva kerül meghatározásra.

2. REFERENCIA-MÓDSZER

2.1. **Reagensek**

2.1.1. 1 g/l standard vas(III)-oldat.

Ez az oldat úgy is elkészíthető, hogy feloldunk 8,6341 g vas(III)-ammónium-szulfátot $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ desztillált vízben, amelyet 1 M sósavval enyhén megszavanyítunk, és feltöltünk egy literre.

2.1.2. 100 mg/l hígított standard vas(III)-oldat.

2.2. **Eszközök**

2.2.1. Rotációs bepárló, termosztatikus szabályozású vízfürdővel.

2.2.2. Atomabszorpciós spektrofotómeter acetilén-levegő gázhoz alkalmazható égőfejjel felszerelve.

2.2.3. Vas vajtkatód lámpa.

2.3. **Eljárás**2.3.1. *A minta előkészítése*

Távolítsuk el az alkoholt a borból úgy, hogy a minta térfogatát eredeti térfogatának felére csökkentjük rotációs bepárlóval (50–60 °C), majd töltsük fel az eredeti térfogatra desztillált vízzel.

Szükség esetén a meghatározás előtt hígítsuk a mintát.

2.3.2. *Kalibrációs oldatok készítése*

Öntsünk 1, 2, 3, 4, illetve 5 ml 100 mg/l vasat tartalmazó oldatot (2.1.2. pont) öt 100 ml-es mérőlombik mindegyikébe, és töltsük fel 100 ml-re desztillált vízzel. Az így előkészített oldatok 1, 2, 3, 4, illetve 5 mg/l vasat tartalmaznak.

Ezeket az oldatokat polietilénpalackokban kell tárolni.

2.3.3. *Meghatározás*

Állítsuk be a hullámhosszat 248,3 nm-re. Állítsuk be a nulla pontot az abszorbanciakálán desztillált víz felhasználásával. Mérjük először a hígított mintát, majd egymás után a 2.3.2. pontban leírtak szerint előkészített standard oldatot. Olvassuk le az abszorbanciákat. Végezzük el a méréseket kétszer.

2.4. **Az eredmények megadása**2.4.1. *Számítási mód*

Vegyük fel a kalibrációs görbét, amely az abszorbancia változását mutatja a standard oldatokban lévő vaskoncentráció függvényében. Jelöljük meg a hígított bormintából nyert abszorbancia-átlagértéket ezen a grafikonon, és határozzuk meg a C vastartalmat.

A bor vastartalmát mg/l-ben

$$C \times F$$

adja meg egész számra kerekítve, ahol F a hígítási tényező.

23 RÉZ (OIV-AS 322-06) – IV. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. A MÓDSZER ELVE
A módszer atomabszorpciós spektrofotometrián alapul.
2. ESZKÖZÖK
 - 2.1. Platinacsésze.
 - 2.2. Atomabszorpciós spektrofotométer.
 - 2.3. Réz vájtkatód lámpa.
 - 2.4. Gáz: levegő-acetilén vagy dinitrogén-oxid/acetilén.
3. REAGENSEK
 - 3.1. Réz(fém).
 - 3.2. 65 %-os salétromsav, HNO_3 , $\rho_{20} = 1,38 \text{ g/ml}$.
 - 3.3. 1:2 V/V arányban hígított salétromsav.
 - 3.4. **1g/l rézoldat.**
Használjunk kereskedelmi 1 g/l-es rézoldatot. Ez az oldat úgy is előállítható, hogy pontosan 1 000 g fém rezet lemérünk, és átesszük egy 1 000 ml-es mérőlombikba. Hozzáadunk 1:2 arányban (V/V) hígított salétromsavat (3.3.) éppen olyan mennyiségben, hogy a fémet feloldja, majd adjunk hozzá 10 ml tömény salétromsavat (3.2.), és töltsük fel jelig kétszer desztillált vízzel.
 - 3.5. **100 mg/l rézoldat.**
Töltsünk 10 ml, a 3.4. szakasz szerint előkészített oldatot egy 100 ml-es mérőlombikba, és töltsük fel jelig kétszer desztillált vízzel.
4. ELJÁRÁS
 - 4.1. **A minta előkészítése és a réz meghatározása**
Töltsünk 20 ml mintát egy 100 ml-es mérőlombikba, és töltsük fel jelig kétszer desztillált vízzel. Amennyiben szükséges, változtassunk a hígítási arányon.

Állítsuk be az abszorbanciaskála nulla pontját desztillált vízzel, majd olvassuk le az atomabszorpciós spektrofotométerről a hígított minta 324,8 nm hullámhosszon bekövetkező abszorbanciáját Szükség esetén készítsünk megfelelően hígított oldatot kétszer desztillált vízzel.
 - 4.2. **A kalibrációs görbe elkészítése**
Pipetázzunk az oldatból (3.5. pont) (100 mg/l réz) 0,5, 1 és 2 ml-t 100 ml-es mérőlombikokba, és töltsük fel a lombikokat jelig kétszer desztillált vízzel. Az így kapott oldatok 0,5, 1 és 2 mg/l rezet tartalmaznak. Avec les valeurs des absorbances de ces solutions, mesurées comme il est décrit au point 4.1., construire la courbe d'étalonnage.
5. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA
A minták mért abszorbanciáját felhasználva olvassuk le a C koncentrációt mg/l-ben a kalibrációs görbéről.

Ha F a hígítási tényező, a bor réztartalmát mg/l-ben $F \times C$ segítségével kapjuk meg.

Az eredményt két tizedes pontossággal adjuk meg.

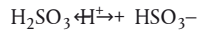
Megjegyzések:
 - a) A kalibrációs görbe létrehozásához olyan oldatokat válasszunk, és a mintáknál olyan hígítást alkalmazzunk, amely megfelel az alkalmazandó készülék érzékenységének és a minta rézkoncentrációjának.

- b) Ha az analizálandó minta várható réztartalma nagyon alacsony, járjunk el a következőképpen. Töltsünk 100 ml mintát egy platinacsészébe, és párologtassuk vízfürdőn 100 °C hőmérsékleten, amíg sziruposá válik. Adjunk hozzá cseppenként 2,5 ml koncentrált salétromsavat (3.2. pont) úgy, hogy az teljesen fedje az edény alját. Óvatosan hamvasszuk a maradékot egy elektromos főzőlapon vagy kis lángon. Ezután helyezzük az edényt egy tokoskemencébe 500 ± 25 °C hőmérsékleten, és tartsuk ott legalább egy órán át. Lehűtés után nedvesítsük meg a hamut 1 ml koncentrált salétromsavval (3.2. pont), miközben egy üvegrúddal péppé keverjük; hagyjuk a keveréket párologni, és az előbbieik szerint ismét hamvasszuk. Helyezzük az edényt ismét 15 percre a tokoskemencébe; ismételjük meg a salétromsavas kezelést legalább háromszor. Oldjuk fel a hamut 1 ml koncentrált salétromsavval (3.2. pont) és 2 ml kétszer desztillált vízzel, és töltsük át az edényből az egészet egy 10 ml-es lombikba. Mossuk ki az edényt háromszor, minden alkalommal 2 ml kétszer desztillált vizet használva. Végül töltsük fel a lombikot 10 ml-re kétszer desztillált vízzel. A 4.1. pontban leírtak szerint, a 10 ml oldat felhasználásával kezdjük hozzá a meghatározáshoz, az eredmények megadása során vegyük figyelembe a koncentrációs tényezőt.

24 KÉN-DIOXID (OIV- AS-323-04-DIOSU) – II. TÍPUSÚ MÓDSZER

1. MEGHATÁROZÁSOK

A mustban és borban lévő szabad kén-dioxid a H_2SO_3 és a HSO_3^- formákban van jelen. Az e formák közötti egyensúly a pH és a hőmérséklet függvénye:



H_2SO_3 molekuláris kén-dioxidot reprezentál.

Az összes kén-dioxidot a borban lévő kén-dioxid valamennyi formájának összegeként határozzuk meg, legyen az szabad vagy kötött állapotban.

2. SZABAD ÉS ÖSSZES KÉN-DIOXID

2.1. A módszerek elve

2.1.1. Referencia-módszer

2.1.1.1. Borok és mustok esetében

A kén-dioxidot levegő vagy nitrogén áramlásával visszük át; hígított és semleges hidrogén-peroxid oldaton átbuborékolatva kötjük le, és oxidáljuk. A képződött kénsavat standard nátrium-hidroxid-oldattal titrálva határozzuk meg. A szabad kén-dioxidot alacsony hőmérsékleten (10 °C) távolítjuk el a borból.

Az összes kén-dioxidot magas hőmérsékleten (kb. 100 °C) hajtjuk ki a borból.

2.1.1.2. Finomított mustsűrítmények esetében

A kén-dioxidot az előzőleg hígított finomított mustsűrítmenyből vonjuk ki magas hőmérsékleten (kb. 100 °C).

2.1.2. Gyors meghatározási módszer (borok és mustok esetében)

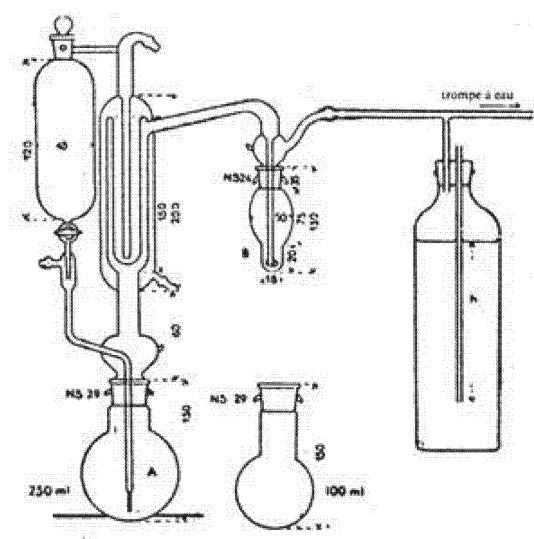
A szabad kén-dioxidot közvetlen jodometriás titrálással határozzuk meg.

A kötött kén-dioxidot lúgos hidrolízist követő jodometriás titrálással ezt követően határozzuk meg. A szabad kén-dioxidhoz hozzáadva kapjuk meg az összes kén-dioxid tartalmát.

2.2. Referencia-módszer

2.2.1. Eszközök

2.2.1.1. Az alkalmazott készüléknek meg kell felelni az alábbi ábrának, különösen a hűtő tekintetében.



1. ábra

A méretek mm-ben olvashatók. A hűtőt alkotó négy koncentrikus cső belső átmérője 45, 34, 27 és 10 mm.

A B buborékolatába vezető gázbevezető cső egy apró, 1 cm átmérőjű gömbben végződik, amelynek horizontális kerületén 20 db 0,2 mm átmérőjű lyuk található. Ez a cső fritt üveglapban is végződhet, amely nagyszámú, igen apró buborékot hoz létre, ezáltal biztosítván a megfelelő érintkezést a folyadék- és a gázfázis között.

A készüléken áthaladó gázmennyiség kb. 40 l/óra legyen. Az ábra jobb oldalán látható palack célja, hogy 20–30 cm méretű vízoszlopra korlátozza a vízsugárszivattyú által létrehozott nyomáscsökkenést. A megfelelő értékű vákuum beállításához egy félkapilláris csővel ellátott áramlásmérőt kell a buborékolat és a palack közé szerelni.

2.2.1.2. Egy mikrobüretta.

2.2.2. Reagensek

2.2.2.1. 85 %-os foszforsav (H_3PO_4) ($\rho_{20} = 1,71$ g/ml).

2.2.2.2. 9,1 g/l 3 % (V/V) hidrogén-peroxid-oldat.

2.2.2.3. Indikátor reagens:

metil-vörös.....	100 mg
metilén-kék.....	50 mg
50 % (V/V) alkohol.....	100 ml

2.2.2.4. 0,01 M nátrium-hidroxid oldat, NaOH.

2.2.3. A szabad kén-dioxid meghatározása

2.2.3.1. Eljárás

A mustot teletöltött és ledugózott palackban kell tárolni 20 °C hőmérsékleten két napon keresztül a meghatározást megelőzően.

— Töltsünk 2–3 ml hidrogén-peroxid oldatot (2.2.2.2. pont) és két csepp indikátorreagenst a B buborékolatába, és semlegesítsük a hidrogén-peroxid-oldatot 0,01 M nátrium-hidroxid oldattal (2.2.2.4. pont). Csatlakoztassuk a buborékolatát a készülékhez.

— Töltsünk 50 ml mintát és 15 ml foszforsavat (2.2.2.1. pont) a készülék A lombikjába. Csatlakoztassuk a lombikot a készülékhez.

— Buborékolatassunk át rajta levegőt (vagy nitrogént) 15 percen keresztül. Az átvitt szabad kén-dioxid kénsavvá oxidálódik. Vegyük le a buborékolatát a készülékről, és titráljuk a képződött savat 0,01 M nátrium-hidroxiddal (2.2.2.4. pont). Legyen n a felhasznált térfogat.

2.2.3.2. Az eredmények megadása

A felszabadított kén-dioxidot mg/l-ben határozzuk meg, egész számra kerekítve.

2.2.3.2.1. Számítási mód

A szabad kén-dioxid-tartalom mg/l-ben: $6,4 n$.

2.2.4. Az összes kén-dioxid-tartalom meghatározása

2.2.4.1. Eljárás

2.2.4.1.1. Finomított mustsűrítmény esetében használjuk a vizsgálandó mintát 40 % (m/V)-ra hígítva, amint azt az összes savtartalomról szóló fejezet 5.1.2. pontjában leírtuk. Töltsünk 50 ml ilyen oldatot és 5 ml foszforsavat (2.2.2.1. pont) az elválasztó készülék 250 ml-es A lombikjába. Csatlakoztassuk a lombikot a készülékhez.

2.2.4.1.2. Borok és mustok

Ha a minta becsült koncentrációja nem több, mint 50 mg összes SO_2 literenként, töltsünk 50 ml mintát és 15 ml foszforsavat (2.2.2.1. pont) az elválasztó készülék 250 ml-es A lombikjába. Csatlakoztassuk a lombikot a készülékhez.

Ha a minta becsült koncentrációja több mint 50 mg összes SO_2 literenként, töltsünk 20 ml mintát és 5 ml foszforsavat (2.2.2.1. pont) az elválasztó készülék 100 ml-es A lombikjába. Csatlakoztassuk a lombikot a készülékhez.

Töltsünk 2–3 ml hidrogén-peroxid oldatot (2.2.2.2. pont) a B buborékolatába, az előbbieknél megfelelően semlegesítve, és forraljuk fel az A lombikban lévő bort 4–5 cm-es kis láng használatával, amely közvetlenül érje a lombik alját. A lombikot ne fémlerezre, hanem egy olyan lemezre tegyük, amelyen egy kb. 30 mm átmérőjű lyuk van. Ennek az a célja, hogy elkerüljük az extrakt anyagok lombik falára való égését.

Tartsuk forrásban, miközben levegő (vagy nitrogén) áramlik át rajta. 15 percen belül az összes kén-dioxid átjut, és oxidálódik. Határozzuk meg a 0,01 M nátrium-hidroxid-oldattal (2.2.2.4. pont) történő titrálással képződött kénsavat.

Legyen n a felhasznált térfogat.

2.2.4.2. Az eredmények megadása

Az összes kén-dioxid-tartalmat mg/l-ben vagy az összes cukor kg-jára számított mg/kg-ban határozzuk meg, egész számra kerekítve.

2.2.4.2.1. Számítási mód

— Borok és mustok

Az összes kén-dioxid-tartalom mg/l-ben:

— alacsony kén-dioxid-tartalmú minták (50 ml-es vizsgálati minta):

$$6,4 \times n$$

— egyéb minták (20 ml-es vizsgálati minta):

$$16 \times n$$

— Finomított mustsűrítmény

Az összes kén-dioxid mg-ban az összes cukor kg-jára számítva (50 ml előkészített vizsgálati minta (2.2.4.1.1. pont)):

$$(1,600 \times n)/P$$

P a % (m/m)-ban kifejezett összes cukortartalom

2.2.3.4.2. Ismételhetség (r)

50 ml-es vizsgálati minta < 50 mg/l; r 1 mg/l.

20 ml-es vizsgálati minta > 50 mg/l; r 6 mg/l.

2.2.3.4.3. Reprodukálhatóság (R)

50 ml-es vizsgálati minta < 50 mg/l; R 9 mg/l.

20 ml-es vizsgálati minta > 50 mg/l; R 15 mg/l.
