REGOLAMENTO (CE) N. 761/1999 DELLA COMMISSIONE

del 12 aprile 1999

recante modifica del regolamento (CEE) n. 2676/90 che determina i metodi di analisi da utilizzare nel settore del vino

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CEE) n. 822/87 del Consiglio, del 16 marzo 1987, relativo all'organizzazione comune del mercato vitivinicolo [1], modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1627/98 [2], in particolare l'articolo 74,

considerando che il regolamento (CEE) n. 2676/90 della Commissione [3], modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 822/97 [4], descrive nel suo allegato detti metodi di analisi; che il metodo di analisi per l'acido D-malico descritto al capitolo 20 del suddetto allegato si è rivelato poco preciso e che è stato approntato un nuovo metodo più preciso; che è stato messo a punto un nuovo metodo di analisi per i derivati cianici più sensibile e di più facile preparazione; che è stato elaborato a livello internazionale un nuovo metodo per il dosaggio del carbammato di etile nei vini; che questi tre nuovi metodi sono stati convalidati in base a criteri riconosciuti a livello internazionale; che l'applicazione di tali metodi può garantire un migliore controllo della qualità e della genuinità dei vini nonché evitare controversie dovute all'applicazione di metodi di analisi obsoleti e poco affidabili; che la descrizione di tali nuovi metodi è stata adottata dall'Ufficio internazionale della vigna e del vino; che occorre inserirli nel regolamento in questione;

considerando che le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per i vini,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 è modificato come segue:

1) Il capitolo «20. Acido D-malico» è sostituito dal testo dall'allegato I del presente regolamento.
2) Il capitolo «38. Derivati cianici» è sostituito dal testo dell'allegato II del presente regolamento.
3) È aggiunto il capitolo 44 di cui all'allegato III del presente regolamento.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il settimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 12 aprile 1999.

Per la Commissione
Franz FISCHLER
Membro della Commissione

---

[1] GU L 84 del 27.3.1987, pag. 1.
[2] GU L 210 del 28.7.1998, pag. 10.
[3] GU L 272 del 3.10.1990, pag. 1.
[4] GU L 117 del 7.5.1997, pag. 10.

ALLEGATO I

«20. ACIDO D-MALICO

(dosaggio con metodo enzimatico)

1. PRINCIPIO

In presenza di D-malato-deidrogenasi (D-MDH), l'acido D-malico (D-malato) viene ossidato in ossalacetato dalla nicotinammide-adenina-dinucleotide (NAD). L'ossalacetato formato è trasformato in piruvato e biossido di carbonio.

$$\text{D-malato} + NAD^+ \xrightarrow{\text{D-MDH}} \text{piruvato} + CO_2 + NADH + H^+$$

La formazione di NADH, misurata tramite l'aumento dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 334, 340 o 365 nm, è proporzionale alla quantità di D-malato presente.

2. REATTIVI

I reattivi che consentono circa 30 determinazioni si trovano in commercio in confezioni costituiti da un kit comprendente:

a) Flacone n. 1 contenente circa 30 ml di soluzione tampone Hepes acido [N-(2-idrossietil)piperazin-N'-2-etano] solfonico, pH = 9,0 e stabilizzatori;

b) Flacone n. 2 contenente circa 210 mg di NAD liofilizzato;

c) Tre flaconi n. 3 contenenti D-MDH liofilizzato, con titolo 8 unità circa.

Preparazione delle soluzioni

1. Utilizzare il contenuto del flacone n. 1 senza diluizione. Portare la soluzione a 20-25 °C prima dell'uso.

2. Sciogliere il contenuto del flacone n. 2 in 4 ml di acqua bidistillata.

3. Sciogliere il contenuto di uno dei flaconi n. 3 in 0,6 ml di acqua bidistillata. Portare la soluzione a 20-25 °C prima dell'uso.

Stabilità delle soluzioni

Il contenuto del flacone n. 1 si conserva a + 4 °C per almeno un anno; la soluzione 2 si conserva a + 4 °C per circa 3 settimane e a − 20 °C per due mesi; la soluzione 3 si conserva per 5 giorni a + 4 °C.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Spettrofotometro in grado di effettuare misurazioni a 340 nm, massimo di assorbimento del NADH. In alternativa, può essere utilizzato un fotometro a spettro discontinuo in grado di effettuare misurazioni a 334 nm o a 365 nm. Poiché si tratta di misure assolute dell'assorbanza (assenza di gamma di taratura, ma riferimento al coefficiente di estinzione del NADH), devono essere controllate le scale delle lunghezze d'onda e delle assorbanze dello strumento.

3.2. Celle di vetro con cammino ottico di 1 cm o celle monouso.

3.3. Micropipette che consentano di prelevare volumi compresi tra 0,01 e 2 ml.

4. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il dosaggio del D-malato viene effettuato, di norma, direttamente sul vino senza decolorazione preliminare.

La quantità di D-malato nella cella deve essere compresa tra 2 e 50 µg, e pertanto occorre diluire il vino in modo tale che la concentrazione di malato sia compresa tra 0,02 e 0,5 g/l oppure 0,02 e 0,3 g/l, a seconda dello strumento utilizzato.

Tabella di diluizione

Quantità stimata di D-malato/litro		Diluzione con acqua	Fattore di diluzioni F
Misura a:			
340 o 334 nm	365 nm		
< 0,3 g	< 0,5 g	—	1
0,3 − 3,0 g	0,5 − 5,0 g	1 + 9	10

5. MODO DI OPERARE

Lo spettrofotometro è regolato sulla lunghezza d'onda di 340 nm, le misurazioni dell'assorbanza sono effettuate nelle celle con cammino ottico di 1 cm; l'assorbanza zero è regolata rispetto all'aria (senza cella sul cammino ottico) o rispetto all'acqua.

Nelle celle con cammino ottico di 1 cm, introdurre:

	Bianco	Aliquota in esame
Soluzione 1	1,00 ml	1,00 ml
Soluzione 2	0,10 ml	0,10 ml
Acqua bidistillata	1,80 ml	1,70 ml
Campione	—	0,10 ml

Mescolare. Dopo circa 6 minuti, misurare le assorbanze delle soluzioni del bianco e dell'aliquota in esame (A_1).

Aggiungere:

	Bianco	Aliquota in esame
Soluzione 3	0,05 ml	0,05 ml

Mescolare. Attendere la fine della reazione (circa 20 minuti) e misurare le assorbanze delle soluzioni del bianco e dell'aliquota in esame (A_2).

Determinare le differenze di assorbanza ($A_2 - A_1$) del bianco (ΔA_T) e dell'aliquota in esame (ΔA_E). Detrarre la differenza di assorbanza del bianco dalla differenza di assorbanza dell'aliquota in esame: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Osservazione: Il tempo necessario all'azione degli enzimi può variare a seconda del lotto e pertanto il suo valore qui sopra fornito è solo a titolo indicativo. Si raccomanda di determinarlo per ciascun lotto.

L'acido D-malico reagisce rapidamente. Un'attività supplementare dell'enzima trasforma anche l'acido L-tartrico, anche se la velocità è molto inferiore. È questo il motivo per cui si verifica una debole reazione parassita che può essere corretta per estrapolazione (cfr. appendice A).

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La concentrazione, in milligrammi per litro, è calcolata con la seguente formula generale:

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

dove:

V = volume del bianco in ml (qui 2,95 ml)
v = volume del campione in ml (qui 0,1 ml)
PM = peso molecolare della sostanza da dosare (qui acido D-malico = 134,09)
d = cammino ottico della cella in cm (qui 1 cm)
ε = coefficiente di assorbimento del NADH:
a 340 nm = 6,3 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
a 365 nm = 3,4 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
a 334 nm = 6,18 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Se nella preparazione del campione è stata effettuata una diluizione, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

La concentrazione in acido D-malico è espressa in milligrammi per litro (mg/1) senza decimali.

7. FEDELTÀ

I dati del test interlaboratori sulla fedeltà del metodo sono sintetizzati nell'appendice B. I valori derivati dal test interlaboratori possono essere inapplicabili a gamme di concentrazione dell'analita e a matrici diverse da quelle indicate nell'appendice B.

7.1. **Ripetibilità**

La differenza assoluta tra 2 singoli risultati ottenuti su una materia identica, da parte di un operatore che utilizza la stessa apparecchiatura, nel più breve intervallo di tempo, non dovrà essere maggiore del valore di ripetibilità r in più del 5 % dei casi.

Il valore è: r = 11 mg/l

7.2. **Riproducibilità**

La differenza assoluta tra due singoli risultati ottenuti su una materia identica in due laboratori non dovrà essere maggiore del valore di riproducibilità R in più del 5 % dei casi.

Il valore è : R = 20 mg/l

8. OSSERVAZIONI

In considerazione della precisione del metodo, i valori di acido D-malico inferiori a 50 mg/l devono, se necessario, essere confermati con un altro metodo di analisi che si basi su un altro principio di misura, ad esempio il metodo di Przyborski ed altri (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

L'aliquota di vino nella cella non deve essere superiore a 0,1 ml, allo scopo di evitare eventuali inibizioni dell'attività enzimatica da parte dei polifenoli.

Appendice A

Come trattare le reazioni parassite

Le reazioni parassite sono generalmente dovute a reazioni secondarie dell'enzima, alla presenza di altri enzimi nella matrice del campione o all'interazione di uno o più elementi della matrice con un cofattore della reazione enzimatica.

Nella reazione normale l'assorbanza raggiunge un valore costante dopo un certo tempo, in genere 10-20 minuti, a seconda della velocità della reazione enzimatica specifica. Tuttavia, in caso di reazioni secondarie, l'assorbanza non raggiunge un valore costante, ma aumenta regolarmente nel tempo: questo tipo di processo viene usualmente chiamato "reazione parassita".

Qualora si presenti questo problema, occorre misurare l'assorbanza della soluzione ad intervalli regolari (2-5 minuti), dopo il tempo necessario affinché la soluzione-standard raggiunga la sua assorbanza finale. Quando l'assorbanza aumenta regolarmente, procedere a 5 0 6 misure; operare quindi un'estrapolazione grafica o mediante calcolo per ottenere il valore dell'assorbanza della soluzione al momento in cui è stato aggiunto l'enzima finale (T0). La differenza di assorbanza estrapolata a quel momento (Af − Ai) viene utilizzata nel calcolo della concentrazione del substrato.

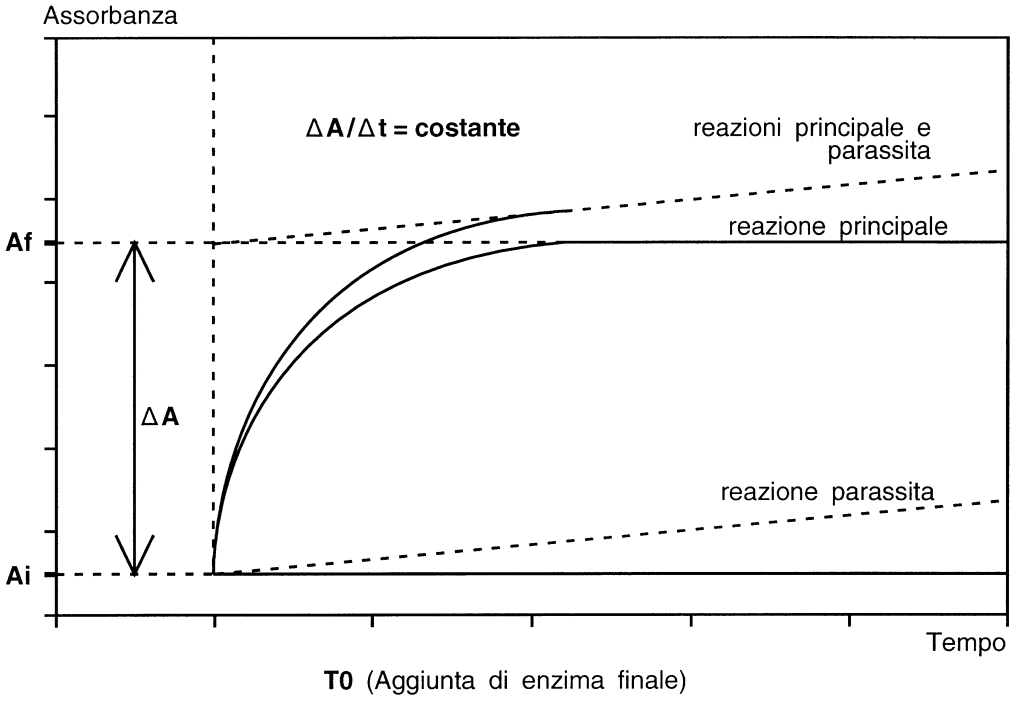


Figura 1: reazione parassita

Appendice B

Risultati statistici del test interlaboratori

Anno del test interlaboratori: 1995
Numero di laboratori: 8
Numero di campioni: 5 con aggiunta di acido D-malico

Campione	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati, dopo l'eliminazione dei laboratori con risultati aberranti	7	8	7	8	7
Numero di laboratori con risultati aberranti	1	—	1	—	1
Numero di risultati accettati	35	41	35	41	36
Valore medio ($\bar{\chi}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Deviazione standard di ripetibilità (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Deviazione standard relativa alla ripetibilità (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Limite di ripetibilità (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Deviazione standard di riproducibilità (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Deviazione standard relativa alla riproducibilità (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Limite di riproducibilità (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Tipi di campioni:
A: vino rosso; B: vino rosso; C: vino bianco; D: vino bianco; E: vino bianco.»

ALLEGATO II

«38. **DERIVATI CIANICI**

(*Attenzione*: rispettare le prescrizioni di sicurezza per le manipolazioni dei prodotti chimici, per la clorammina T, la piridina, il cianuro di potassio, l'acido cloridrico e l'acido fosforico. Per lo smaltimento dei prodotti usati, attenersi a modalità conformi alle norme e ai regolamenti ecologici in materia. Opportuna cautela per l'acido cianidrico liberato nella distillazione del vino acidificato).

1. PRINCIPIO

L'acido cianidrico libero e totale del vino viene liberato per idrolisi acida e separato per distillazione. Dopo reazione con la clorammina T e la piridina, il dialdeide glutaconico formato è dosato per colorimetria, grazie alla colorazione blu che manifesta con l'acido dimetil 1,3 barbiturico.

2. APPARECCHIATURA

2.1. **Apparecchiatura di distillazione**

Utilizzare l'apparecchiatura di distillazione descritta per la determinazione del titolo alcolometrico volumico del vino

2.2. Pallone da 500 ml a smerigliatura normalizzata

2.3. Bagnomaria termostatato a 20 °C

2.4. Spettrofotometro che consenta misurazioni dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 590 nm

2.5. Celle di vetro o celle monouso con cammino ottico di 20 mm

3. REAGENTI

3.1. Acido fosforico (H_3PO_4) al 25 % (m/v)

3.2. Soluzione di clorammina T($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$) al 3 % (m/v)

3.3. Soluzione di acido 1,3-dimetilbarbiturico: sciogliere 3,658 g di acido 1,3-dimetilbarbiturico ($C_6H_8N_2O_3$) in 15 ml di piridina e 3 ml di acido cloridrico (ρ_{20} = 1,19 g/ml) e portare a 50 ml con acqua distillata.

3.4. Cianuro di potassio (KCN)

3.5. Soluzione di ioduro di potassio (KI) al 10 % (m/v)

3.6. Soluzione di nitrato d'argento ($AgNO_3$), 0,1 M

4. MODO DI OPERARE

4.1. **Distillazione**

Nel pallone da 500 ml (2.2) introdurre 25 ml di vino, 50 ml di acqua distillata, 1 ml di acido fosforico (3.1) ed alcune perle di vetro. Posizionare immediatamente il pallone sull'apparecchio di distillazione. Mediante un tubo sottile, travasare il distillato in una beuta graduata da 50 ml contenente 10 ml d'acqua. La beuta viene immersa in acqua ghiacciata. Raccogliere 30-35 ml di distillato (ossia circa 45 ml di liquido totale nella beuta graduata).

Lavare il tubo sottile del refrigerante con qualche millilitro di acqua distillata, portare a 20 °C il distillato e portarlo al livello della tacca con acqua distillata.

4.2. **Misurazione**

Porre 25 ml di distillato in una beuta conica da 50 ml munita di tappo smerigliato, aggiungere 1 ml di soluzione di clorammina T (3.2) e tappare ermeticamente. Dopo esattamente 60 secondi aggiungere 3 ml di soluzione di acido dimetil-1,3 barbiturico (3.3), tappare ermeticamente e lasciar riposare per 10 minuti. Misurare quindi l'assorbanza rispetto al bianco (25 ml di acqua distillata invece di 25 ml di distillato) alla lunghezza d'onda di 590 nm nelle celle con cammino ottico di 20 mm.

5. COSTRUZIONE DELLA CURVA DI TARATURA

5.1. **Titolazione argentimetrica del cianuro di potassio**

In una beuta graduata da 300 ml sciogliere circa 0,2 *g* di KCN (3.4) esattamente pesata in 100 ml di acqua distillata. Aggiungere 0,2 ml di soluzione di ioduro di potassio (3.5) e titolare con la soluzione di nitrato di 0,1 M (3.6) sino ad ottenere una colorazione giallastra stabile.

1 ml di soluzione 0,1 M di nitrato d'argento corrispondente a 13,2 mg di KCN, calcolare il titolo del campione di KCN.

5.2. **Curva dello standard**

5.2.1. *Preparazione delle soluzioni standard*

Una volta noto il titolo del KCN determinato secondo il punto 5.1, preparare una soluzione standard contenente 30 mg/l di acido cianidrico (30 mg HCN ≅ 72,3 mg KCN). Diluire questa soluzione a 1/10.

Introdurre 1,0- 2,0- 3,0- 4,0- e 5,0 ml della soluzione standard diluita nelle beute graduate da 100 ml e portare al livello della tacca con acqua distillata. Le soluzioni preparate hanno rispettivamente i titoli 30-60-90-120 e 150 µg/l di acido cianidrico.

5.2.2. *Dosaggio*

Prelevare 25 ml delle soluzioni così ottenute e proseguire come indicato ai precedenti punti 4.1 e 4.2.

I valori delle assorbanze ottenuti con queste soluzioni standard riportati in funzione dei corrispondenti tenori di acido cianidrico sono allineati su una retta passante per l'origine.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

L'acido cianidrico è espresso in microgrammi per litro (µg/l), senza decimali.

6.1. **Calcolo**

Leggere il tenore di acido cianidrico sulla curva di taratura. Se è stata effettuata una diluizione, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Ripetibilità (r) e riproducibilità (R)

Vino bianco = $r = 3{,}1$ µg/l ossia circa $6\ \% \cdot x_i$

$R = 12$ µg/l ossia circa $25\ \% \cdot x_i$

Vino rosso = $r = 6{,}4$ µg/l ossia circa $8\ \% \cdot x_i$

$R = 23$ µg/l ossia circa $29\ \% \cdot x_i$

x_i = concentrazione media di HCN nel vino

$x_i = 48{,}4$ µg/l per il vino bianco

$x_i = 80{,}5$ µg/l per il vino rosso.»

ALLEGATO III

44. DOSAGGIO DEL CARBAMMATO DI ETILE NEI VINI: METODO DI RIVELAZIONE SELETTIVA PER CROMATOGRAFIA IN FASE GASSOSA/SPETTROMETRIA DI MASSA

(Applicabile nella determinazione del carbammato di etile per concentrazioni comprese tra 10 e 200 µg/l).

(*Attenzione:* rispettare le prescrizioni di sicurezza per le manipolazioni dei prodotti chimici, per l'etanolo, l'acetone ed i prodotti cancerogeni: carbammato di etile e diclorometano. Per lo smaltimento dei solventi usati attenersi a modalità conformi alle norme e ai regolamenti ecologici in materia).

A. **Principio del metodo**

Il carbammato di propile viene aggiunto ad un campione come standard interno, la soluzione viene diluita con acqua e viene posta in una colonna di estrazione in fase solida da 50 ml. Il carbammato di etile e il carbammato di propile vengono eluiti con diclorometano.

L'eluato viene concentrato mediante un evaporatore a rotazione sotto vuoto. Il concentrato viene analizzato per cromatografia in fase gassosa (CG); la rivelazione viene effettuata mediante spettrometria di massa per fragmentometria in modo SIM (Selected ions monitoring).

B. **Apparecchiatura e condizioni cromatografiche (dati a titolo esemplificativo)**

a) Gascromatografo/spettrometro di massa (CG/SM) ed eventualmente un dispositivo di trasporto di campioni ed un sistema di trattamento dati o equivalente.

Colonna capillare di silice 30 m (*) × 0,25 mm diametro interno 0,25 µm di pellicola di tipo Carbowax 20M.

Modo di operare: iniettore 180 °C, gas vettore elio a 1 ml/min. e a 25 °C, iniezione secondo il metodo «Splitless/split».

Programma temperatura: 40 °C per 0,75 minuti, poi programmazione a 10 °C/minuto sino a 60 °C, poi 3 °C/minuto sino a 150 °C (**), arrivare a 220 °C e poi mantenere a questa temperatura per 4,25 minuti. Il tempo di ritenzione specifica del carbammato di etile è di 23-27 minuti, quello del carbammato di metile è di 27-31 minuti.

Gascromatografo/spettrometro (CG/SM) interfaccia: linea di trasferimento 220 °C. Parametri dello spettrometro di massa regolati manualmente con perflurotributilammina ed ottimizzati per una sensibilità di massa più bassa, modo di acquisizione (SIM), termine solvente e tempo di inizio dell'acquisizione 22 minuti, tempo di mantenimento/ione 100 ms.

b) Evaporatore a rotazione sotto vuoto o dispositivo di concentrazione di tipo Kuderna Danish

[*NB:* Il tasso di recupero del carbammato di etile del campione test, C(g), deve essere compreso tra il 90 e il 110 % durante il processo].

c) Beuta — a forma di pera, 300 ml, collo unico smerigliato.

d) Tubo di concentrazione — 4 ml, graduato, con un giunto a pellicola di teflon e tappo.

C. **Reattivi**

a) Acetone — qualità LC

NB: (Verificare ogni lotto prima dell'utilizzazione in CG/SM per quanto riguarda l'assenza di risposta per gli ioni di m/z 62, 74 e 89.)

b) Diclorometano

(*NB:* Analizzare ogni lotto prima dell'utilizzazione in CG/SM dopo concentrazione 200 volte, concentrazione per verificare l'assenza di risposta per gli ioni di m/z 62, 74 e 89.)

c) Etanolo — anidro

(*) Per certi vini particolarmente ricchi, è consigliabile utilizzare una colonna capillare di 50 m di lunghezza.
(**) Per certi vini particolarmente ricchi, può essere consigliabile effettuare una programmazione della temperatura di 2 °C/minuto.

d) Carbammato di etile (CE), soluzioni standard

1. Soluzione «madre» — 1,00 mg/ml. Pesare 100 mg CE (purezza ≥ 99 %) in una beuta volumetrica da 100 ml e diluire con acetone.

2. Soluzione standard di lavoro — 10,0 µg/ml. Trasferire 1 ml della soluzione «madre» CE in una beuta volumetrica da 100 ml e diluire con acetone sino al livello della tacca.

e) Carbammato di propile (CP), soluzioni standard

1. Soluzione «madre» — 1,00 mg/ml. Pesare 100 mg CP (qualità reattivo) in una beuta volumetrica da 100 ml e diluire con acetone sino al livello della tacca.

2. Soluzione standard di lavoro — 10,0 µg/ml. Trasferire 1 ml della soluzione madre CP in una beuta volumetrica da 100 ml e diluire con acetone sino al livello della tacca.

3. Soluzione standard interno CP — 400 ng/ml. Trasferire 4 ml di soluzione standard di lavoro in una beuta volumetrica da 100 ml e diluire con acqua sino al livello della tacca.

f) Soluzioni standard calibrate CE-CP

Diluire le soluzioni standard di lavoro di CE, d) 2, e CP e) 2, con diclorometano ottenendo:

1. (100 ng CE e 400 ng CP)/ml;

2. (200 ng CE e 400 ng CP)/ml;

3. (400 ng CE e 400 ng CP)/ml;

4. (800 ng CE e 400 ng CP)/ml;

5. (1 600 ng CE e 400 ng CP)/ml.

g) Campione test — 100 ng CE/ml in 40 % di etanolo.

Trasferire 1 ml delle soluzioni standard di lavoro CE, d) 2 in una beuta volumetrica da 100 ml e diluire con 40 % di etanolo sino al livello della tacca.

h) Colonna di estrazione in fase solida — Materiale monouso, preconfezionato con terra di diatomee, capacità 50 ml

NB: Prima dell'analisi, verificare ogni lotto di colonne di estrazione per il recupero del CE e del CP, e l'assenza di risposta per gli ioni di m/z 62, 74 e 89. Preparare 100 ng CE/ml di campione test (g). Analizzare 5,00 ml del campione test come descritto in D a), E e F. Il recupero di 90-110 ng di CE/ml è soddisfacente. Adsorbenti con particelle di diametro irregolare possono comportare flussi molto lenti che influiscono sul recupero del CE e del CP. Se dopo diverse prove non si è ottenuto il 90-110 % del valore del campione test, cambiare la colonna o utilizzare una curva di taratura di recupero corretta per quantificare il CE. Per ottenere la curva di taratura corretta, preparare delle soluzioni standard come descritto in f) utilizzando 40 % di etanolo invece di diclorometano.

Analizzare 1 ml della soluzione standard di taratura come descritto in D, E e F.

Costruire una nuova curva di taratura utilizzando il rapporto CE/CP degli standard estratti.

D. **Preparazione del campione test**

Porre il materiale test in due becher distinti da 100 ml utilizzando le seguenti quantità:

a) per vini con titolo alcolometrico volumico maggiore del 14 % vol.: 5,00 ± 0,01 ml;

b) per vini con titolo alcolometrico volumico pari al massimo al 14 % vol.: 20,00 ± 0,01 ml.

In ciascun becher aggiungere 1 ml di soluzione CP di standard interno, C e) 3 ed acqua per ottenere un volume totale di 40 ml (o 40 g).

E. **Estrazione**

Eseguire l'estrazione sotto la cappa aspirante con ventilazione adeguata.

Trasferire il preparato di cui alla lettera D nella colonna di estrazione.

Risciacquare il becher con 10 ml di acqua e trasferire l'acqua di risciacquo nella colonna.

Lasciare che il liquido si absorba nella colonna per 4 minuti. Eluire con 2 × 80 ml di diclorometano. Raccogliere l'eluato in una beuta conica da 300 ml.

Evaporare l'eluato sino a 2-3 ml mediante l'evaporatore a rotazione in bagnomaria a 30 °C (*NB:* non lasciare evaporare a secco).

Trasferire il residuo concentrato in un tubo graduato da 4 ml con una pipetta Pasteur.

Sciacquare la beuta con 1 ml di diclorometano e trasferire il liquido di lavaggio nel tubo. Concentrare il campione ad 1 ml in debole corrente di azoto

Trasferire eventualmente il concentrato in una beuta del dispositivo di trasporto del campione per l'analisi CG/SM.

F. **Analisi CG/SM**

a) Curva di taratura

Iniettare 1µl di ognuna delle soluzioni standard calibrate C f), in CG/SM. Tracciare il grafico del rapporto delle aree CE-CP per la risposta dello ione m/z 62 sull'asse delle ordinate e riportare sulle ascisse la quantità di CE in ng/ml (ossia 100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml).

b) Quantificazione CE

Iniettare 1µl di estratto concentrato di E nel sistema CG/SM e calcolare i1 rapporto delle aree CE-CP per lo ione m/z 62. Determinare la concentrazione CE (ng/ml) nell'estratto, utilizzando la curva di taratura standard interno. Calcolare la concentrazione CE nel campione test (ng/ml) dividendo la quantità di CE (ng) nell'estratto per il volume del campione test (ml).

c) Verifica della purezza del CE

Determinare se le risposte per gli ioni di m/z 62, 74 e 89 appaiono nel tempo di ritenzione del CE. Queste risposte sono le caratteristiche rispettivamente dei principali fragmenti $(M - C_2H_2)+$ e $(M - CH_3)+$ e dello ione molecolare $(M)^+$. La presenza di CE è confermata se le relative proporzioni di detti ioni non si discostano di oltre il 20 % dalle proporzioni per lo standard di CE. È possibile che occorra riconcentrare l'estratto per ottenere una risposta sufficiente per lo ione di m/z 89.

G. **Analisi collaborativa**

La tabella riporta i singoli risultati per il campione di prova pratica e per i due tipi di vino.

L'applicazione del test di Cochran ha comportato l'eliminazione di una sola coppia di risultati, sia per il vino con titolo alcolometrico maggiore di 14 % vol. che per il vino con titolo alcolometrico minore o uguale a 14 % vol., ciascuno proveniente da un laboratorio differente.

La riproducibilità relativa tende a diminuire con l'aumento della concentrazione di carbammato di etile.

Risultati del metodo per la determinazione della presenza di carbammato di etile CE nelle bevande alcoliche mediante CG/SM

Campione	Media di CE trovato (ng/ml)	Ricupero di CE aggiunto (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Vino con titolo alcolometrico maggiore di 14 % vol.	40		1,59	4,77	4,01	12,02
	80	89	3,32	7,00	4,14	8,74
	162	90	8,20	11,11	5,05	6,84
Vino con titolo alcolometrico minore di 14 % vol.	11		0,43	2,03	3,94	18,47
	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86