31999R0761

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 761/1999

z 12. apríla 1999,

ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (EHS) č. 2676/90 stanovujúce analytické metódy spoločenstva pre sektor vína

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na nariadenie Rady (EHS) č. 822/87 zo 16. marca 1987 o spoločnej organizácii trhu s vínom [1], naposledy zmenené a doplnené nariadením (ES) č. 1627/98 [2], najmä na jeho článok 74;

keďže príloha k nariadeniu Komisie (EHS) č. 2676/90 [3], naposledy zmenenému a doplnenému nariadením (ES) č. 822/97 [4], opisuje analytické metódy; keďže analytická metóda kyseliny D-jablčnej opísaná v kapitole 20 sa ukázala ako nepresná a bola vyvinutá nová presnejšia metóda; keďže bola vyvinutá nová analytická metóda kyanidových derivátov, ktorá je citlivejšia a ľahšie sa používa; keďže na medzinárodnej úrovni bola vyvinutá nová metóda zisťovania etylkarbamátu vo víne; keďže tieto tri metódy boli schválené v súlade s medzinárodne uznávanými kritériami; keďže používaním týchto metód možno zabezpečiť lepšiu kontrolu nad kvalitou a pravosťou vína a zabrániť sporom spôsobeným používaním zastaralých a nespoľahlivých analytických metód; keďže opisy nových metód schválil Medzinárodný úrad pre vinič a víno; keďže tieto by mali byť začlenené do nariadenia;

keďže opatrenia ustanovené týmto nariadením sú v súlade so stanoviskom Riadiaceho výboru pre víno,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Príloha k nariadeniu (EHS) č. 2676/90 sa týmto mení a dopĺňa takto:

1. kapitola 20 (Kyselina D-jablčná) sa nahrádza prílohou I k tomuto nariadeniu;
2. kapitola 38 (Kyanidové deriváty) sa nahrádza prílohou II k tomuto nariadeniu;
3. príloha III k tomuto nariadeniu sa pridáva ako kapitola 44.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť siedmy deň od jeho uverejnenia v *Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev*.

Toto nariadenie je záväzné vo svojej celistvosti a je priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 12. apríla 1999

Za Komisiu

Franz FISCHLER

člen Komisie

---

[1] Ú. v. ES L 84, 27.3.1987, s. 1.
[2] Ú. v. ES L 210, 28.7.1998, s. 10.
[3] Ú. v. ES L 272, 3.10.1990, s. 1.
[4] Ú. v. ES L 117, 7.5.1997, s. 10.

PRÍLOHA I

„20. **KYSELINA D-JABLČNÁ**

(enzýmová metóda)

1. PRINCÍP

V prítomnosti D-malát dehydrogenázy (D-MDH) sa kyselina D-jablčná oxiduje nikotínamid-adenín-dinukleotidom (NAD) na oxalacetát. Vytvorený oxalacetát sa štiepi na pyruvát a oxid uhličitý.



Množstvo vytvoreného NADH je úmerné koncentrácii kyseliny D-jablčnej a meria sa pri vlnovej dĺžke 334, 340 alebo 365 nm.

2. ČINIDLÁ

Testovacia sada pre približne 30 stanovení:

a) fľaštička č. 1 obsahujúca asi 30 ml roztoku pozostávajúceho z Hepes tlmivého roztoku (kyseliny 4-(2-hydroxyetyl)piperazín-1-etán sulfónovej) PH = 9,0 a stabilizátorov;

b) fľaštička č. 2 obsahujúca asi 210 mg NAD-lyofilizátu;

c) tri fľaštičky č. 3 obsahujúce D-MDH-lyofilizátu, každá približne s 8 U.

Príprava roztokov

1. Obsah fľaštičky č. 1 použite nezriedený. Pred použitím roztok zohrejte na teplotu 20 až 25 °C.

2. Obsah fľaštičky č. 2 rozpustite v 4 ml redestilovanej vody.

3. Obsah jednej z fľaštičiek č. 3 rozpustite v 0,6 ml redestilovanej vody. Pred použitím roztok zohrejte na teplotu 20 až 25 °C.

Stabilita roztokov

Obsah fľaštičky č. 1 je stabilný aspoň rok, ak sa skladuje pri teplote + 4 °C; roztok č. 2 je stabilný tri týždne, ak sa skladuje pri teplote + 4 °C, a dva mesiace, ak sa skladuje pri teplote –20 °C; roztok č. 3 je stabilný päť dní, ak sa skladuje pri teplote + 4 °C.

3. PRÍSTROJE

3.1. Spektrofotometer, ktorý umožňuje merania pri vlnovej dĺžke 340 nm, keď absorpcia NADH dosahuje maximum. Ak nie je k dispozícii, môže sa použiť aj spektrofotometer s nespojitým zdrojom spektra, ktorý umožňuje merania pri vlnovej dĺžke 334 alebo 365 nm. Keďže ide o merania absolútnej absorbancie (t. j. bez kalibračných roztokov, ale vo vzťahu ku koeficientu extinkcie NADH), je potrebné skontrolovať stupnice vlnovej dĺžky a spektrálnu absorbanciu prístroja.

3.2. Sklenené kyvety s dĺžkou optickej dráhy 1 cm (podľa potreby možno použi aj jednorázové kyvety).

3.3. Mikropipety na pipetovanie objemov od 0,01 do 2 ml.

4. PRÍPRAVA VZORKY

Analýza D-malátu sa zvyčajne vykonáva priamo vo víne bez toho, aby bolo najprv odfarbené.

Množstvo D-malátu v kyvete by sa malo pohybovať medzi 2 a 50 µg. Preto treba víno zriediť tak, aby sa výsledná koncentrácia D-malátu rovnala 0,02 až 0,5 g/l, resp. 0,02 až 0,3 g/l (v závislosti od použitého prístroja).

Tabuľka – Zriedenie:

Odhadované množstvo D-malátu na 1 liter		Zriedenie vodou	Zrieďovací faktor F
Merané pri:			
340 or 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. POSTUP

Nastavte spektrofotometer na vlnovú dĺžku 340 nm a pomocou centimetrových kyviet určite absorbanciu, pričom na nastavenie nulovej absorbancie použite vzduch (bez kyvety v optickej dráhe) alebo vodu.

Do kyviet napipetujte:

	Referenčná vzorka	Testovaná vzorka
Roztok č. 1	1,00 ml	1,00 ml
Roztok č. 2	0,10 ml	0,10 ml
Redestilovaná voda	1,80 ml	1,70 ml
Vzorka na meranie	–	0,10 ml

Premiešajte a asi po šiestich minútach zmerajte absorbanciu roztokov referenčnej a pokusnej vzorky (A_1).

Pridajte:

	Referenčná vzorka	Testovaná vzorka
Roztok č. 3	0,05 ml	0,05 ml

Premiešajte. Počkajte, kým prebehne reakcia (asi 20 minút) a zmerajte absorbanciu roztokov referenčnej a pokusnej vzorky (A_2).

Vypočítajte rozdiel medzi absorbanciami (A_2-A_1) roztokov referenčnej (ΔA_T) a pokusnej vzorky (ΔA_E). Nakoniec vypočítajte rozdiel medzi týmito rozdielmi: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Poznámka: Doba potrebná na dokončenie enzýmovej činnosti môže byť pre každú dávku iná.Vyššie uvedená doba má slúžiť len na orientáciu, pričom sa odporúča stanoviť ju pre každú dávku zvlášť.

Kyselina D-jablčná reaguje prudko. Enzým prenáša aj kyselinu L-vínnu, hoci oveľa pomalšie. Tým sa vysvetľuje mierna vedľajšia reakcia, ktorú možno napraviť pomocou extrapolácie (pozri dodatok A).

6. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

Všeobecný vzorec na výpočet koncentrácie v mg/l je:

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

pričom:

V = objem testovaného roztoku v ml (2,95 ml)

v = objem vzorky v ml (0,1 ml)

PM = molekulová hmotnosť stanovovanej látky (pre kyselinu D-jablčnú je *PM* = 134,09)

d = optická dráha kyvety v cm (1 cm)

ε = absorbčný koeficient NADH:

pri 340 nm = 6,3 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})

pri 365 nm = 3,4 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})

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

Ak bola vzorka pri príprave zriedená, výsledok vynásobte zrieďovacím faktorom.

Koncentrácia kyseliny D-jablčnej sa uvádza v miligramoch na liter (mg/l) bez desatinných miest.

7. PRESNOSŤ

Podrobnosti o medzilaboratórnej skúške presnosti tejto metódy sú zhrnuté v dodatku B. Hodnoty odvodené z medzilaboratórnej skúšky môžu byť nepoužiteľné na iné rozsahy koncentrácií stanovovanej zložky a základných látok, ako sú uvedené v dodatku B.

7.1. **Opakovateľnosť**

Absolútny rozdiel medzi dvoma výsledkami získanými z tej istej vzorky odskúšanými prevádzkovateľom pomocou rovnakého prístroja v najkratšom časovom intervale neprevýši hodnotu opakovateľnosti r vo viac ako 5 % prípadov

R = 11 mg/l.

7.2. **Reprodukovateľnosť**

Absolútny rozdiel medzi dvoma výsledkami získanými z tej istej vzorky odskúšanými v dvoch rozdielnych laboratóriách nepresiahne hodnotu reprodukovateľnosti R vo viac ako 5 % prípadov.

R = 20 mg/l.

8. POZNÁMKY

S ohľadom na mieru presnosti tejto metódy by v prípade potreby mali byť hodnoty kyseliny D-jablčnej menšie ako 50 mg/l potvrdené inou analytickou metódou pri použití iného princípu merania, napr. princípu Przyborského a kol. (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

Vzorka vína v kyvete by nemala presiahnuť objem 0,1 ml, aby sa zabránilo prípadnej inhibícii enzýmovej aktivity polyfenolov.

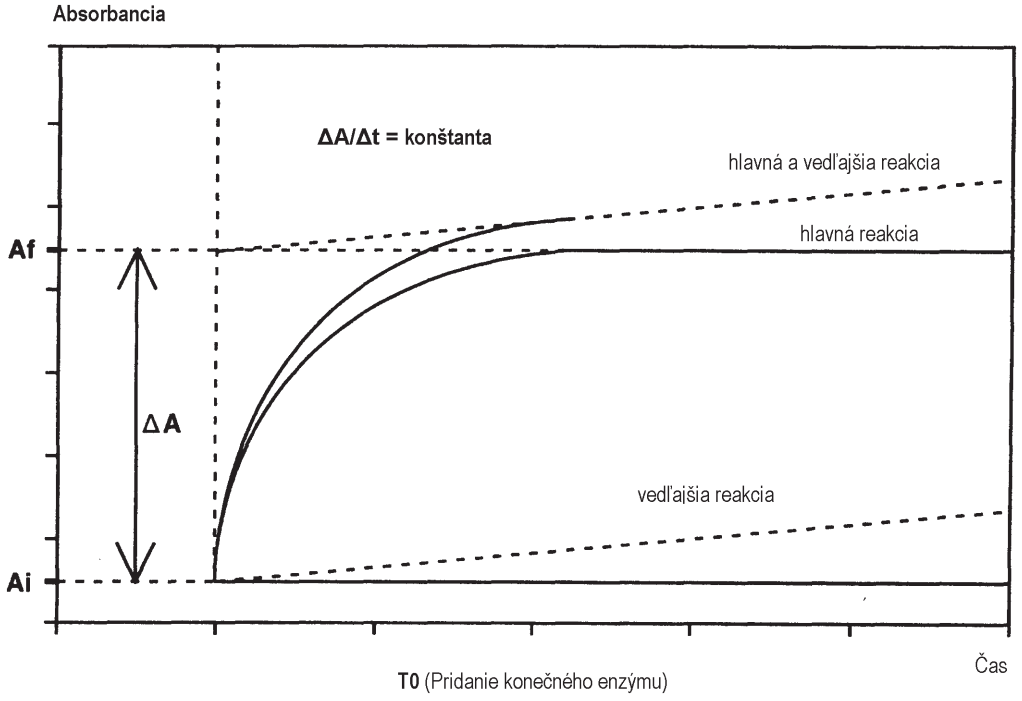
Dodatok A

Ako čeliť vedľajším reakciám

Vedľajšie reakcie sú zväčša spôsobené sekundárnymi reakciami enzýmu na prítomnosť iných enzýmov v základnej vzorke, alebo vzájomnou reakciou jedného alebo viacerých prvkov základnej vzorky so spolufaktorom enzýmovej reakcie.

Pri bežnej reakcii absorbancia dosahuje konštantnú hodnotu po určitom čase – väčšinou po 10-20 minútach v závislosti od rýchlosti konkrétnej enzýmovej reakcie. Keď však dôjde k sekundárnym reakciám, absorbancia nedosahuje konštantnú hodnotu, ale pravidelne sa s postupom času zvyšuje. Tento typ procesu sa bežne nazýva „vedľajšou reakciou".

Keď sa vyskytne vedľajšia reakcia, absorbancia roztoku by mala byť meraná v pravidelných intervaloch (každé dve až päť minút) po uplynutí času požadovaného na dosiahnutie konečnej absorbancie štandardného roztoku. Ak sa absorbancia pravidelne zvyšuje, malo by sa uskutočniť päť až šesť meraní a extrapolovať naspäť pomocou grafu alebo výpočtu. Tak sa určí absorbancia, ktorá by bola pozorovaná po pridaní konečného enzýmu (T0). Koncentrácia substrátu sa vypočíta na základe rozdielu v absorbancii extrapolovanej v danom čase. (Af – Ai).



Obrázok č. 1 Vedľajšia reakcia

Dodatok B

Štatistické výsledky medzilaboratórnej skúšky

Rok medzilaboratórnej skúšky: 1995

Počet laboratórií: 8

Počet vzoriek: 5 s prídavkom kyseliny D-jablčnej

Vzorka	A	B	C	D	E
Počet laboratórií po vylúčení laboratórií s odchylnými výsledkami	7	8	7	8	7
Počet laboratórií s odchylnými výsledkami	1	–	1	–	1
Počet prijatých výsledkov	35	41	35	41	36
Priemerná hodnota () ($\overline{\chi}$)(mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Hranica opakovateľnosti r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Hranica reprodukovateľnosti (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Typy vzoriek:

A: červené víno; B: červené víno; C: biele víno; D: biele víno; E: biele víno;“

PRÍLOHA II

„38. **KYANIDOVÉ DERIVÁTY**

(*Upozornenie*: Dodržujte bezpečnostné opatrenia pre prácu s chemikáliami, chloramínom T, pyridínom, kyanidom draselným, kyselinou chlorovodíkovou a kyselinou fosforečnou. Použité produkty riadne zneškodnite v súlade s platnými pravidlami ochrany životného prostredia. Pozor na kyselinu kyanovodíkovú, ktorá sa uvoľňuje počas destilácie okysleného vína.)

1. PRINCÍP

Všetka voľná kyselina kyanovodíková vo víne sa uvoľňuje kyslou hydrolýzou a oddeľuje sa destiláciou. Reakciou s chloramínom T a pyridínom vzniká glutakónový dialdehyd stanovený kolorimetricky na základe modrého sfarbenia, ktoré vytvára spolu s kyselinou 1,3-dimetylbarbitúrovou.

2. PRÍSTROJE

2.1. **Destilačný prístroj**

Na stanovenie obsahu alkoholu vo víne použite opísaný destilačný prístroj.

2.2. 500 ml banka s okrúhlym dnom a normalizovaným zábrusom

2.3. Vodný kúpeľ s termostaticky riadenou teplotou 20°C

2.4. Spektrofotometer umožňujúci meranie absorbancie pri vlnovej dĺžke 590 nm

2.5. Sklenené kyvety alebo jednorázové kyvety s optickou dráhou 20 mm

3. ČINIDLÁ

3.1. Kyselina fosforečná (H_3PO_4) 25 % (hmotnosť/objem)

3.2. Roztok chloramínu T ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$) 3 % (hmotnosť/objem)

3.3. Roztok kyseliny 1,3-dimetylbarbitúrovej: rozpustite 3,658 g kyseliny 1,3-dimetylbarbitúrovej ($C_6H_8N_2O_3$) v 15 ml pyridínu a 3 ml kyseliny chlorovodíkovej (p_{20}=1,19 g/ml) a pridajte 50 ml destilovanej vody

3.4. Kyanid draselný (KCN)

3.5. Roztok jodidu draselného (KI) 10 % (hmotnosť/objem)

3.6. Roztok dusičnanu strieborného ($AgNO_3$) 0,1 M

4. POSTUP

4.1. **Destilácia**

Do 500 ml banky (2.2) vlejte 25 ml vína, 50 ml destilovanej vody, 1 ml kyseliny fosforečnej (3.1) a niekoľko sklenených guličiek. Banku okamžite položte na destilačný prístroj. Pomocou zašpicatenej rúrky destilát zaveďte do 50 ml kalibračnej banky, v ktorej je 10 ml vody. Ponorte kalibračnú banku do ľadovej vody. Na zbierajte do nej 30 až 35 ml destilátu (alebo celkom asi 45 ml tekutiny).

Zašpicatenú rúrku kondenzátora prepláchnite niekoľkými mililitrami destilovanej vody, zohrejte destilát na 20 °C a doplňte destilovanou vodou až po kalibračnú značku.

4.2. **Meranie**

Do 50 ml kužeľovitej banky so zabrúsenou sklenenou zátkou vlejte 25 ml destilátu, 1 ml roztoku chloramínu T (3.2) a zazátkujte ju. Po presne 60 sekundách pridajte 3 ml roztoku kyseliny 1,3-dimetylbarbitúrovej (3.3), zazátkujte a nechajte banku stáť 10 minút. Potom zmerajte v kyvetách s optickou dráhou 20 mm absorbanciu oproti porovnávacej vzorke (25 ml destilovanej vody namiesto 25 ml destilátu) pri vlnovej dĺžke 590 nm.

5. STANOVENIE KALIBRAČNEJ KRIVKY

5.1. **Argentometrická titrácia kyanidu draselného**

V 300 ml kalibračnej banke rozpustite v 100 ml destilovanej vody asi 0,2 g opatrne odváženého KCN (3.4). Pridajte 0,2 ml roztoku jodidu draselného (3.5) a titrujte s 0,1 M roztokom dusičnanu strieborného (3.6), kým nedosiahnete stabilné žltkasté sfarbenie.

Vypočítajte koncentráciu vzorky KCN za predpokladu, že 1 ml 0,1 M roztoku dusičnanu strieborného zodpovedá 13,2 mg KCN.

5.2. **Štandardná krivka**

5.2.1. *5.2.1. Príprava štandardných roztokov*

Keď určíte koncentráciu KCN podľa postupu uvedeného v bode 5.1, pripravte štandardný roztok obsahujúci 30 ml/l kyseliny kyanovodíkovej (30 ml HCN = 72, 3 mg KCN). Roztok zrieďte v pomere 1/10.

Vlejte do 100 ml kalibračných bánk 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml a 5,0 ml vzorky zriedeného roztoku a doplňte destilovanou vodou až po kalibračnú značku. Pripravené roztoky obsahujú 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg a 150 µg kyseliny kyanovodíkovej na liter.

5.2.2. *Titrácia*

Pokračujte v pracovnom postupe s 25 ml vzorkami takto získaných roztokov podľa návodu v bodoch 4.1 a 4.2.

Hodnoty získané pre absorbanciu u štandardných roztokov majú ako funkcia zodpovedajúceho obsahu kyseliny kyanovodíkovej tvoriť priamku prechádzajúcu začiatkom.

6. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

Kyselina kyanovodíková sa vyjadruje v mikrogramoch na liter (µg/l) bez desatinných miest.

6.1. **Metóda výpočtu**

Obsah kyseliny kyanovodíkovej odčítajte z grafu kalibračnej krivky. Ak bola vzorka zriedená, výsledok vynásobte zrieďovacím faktorom.

Opakovateľnosť r) a reprodukovateľnosť (R)

Biele víno = r = 3,1 µg/l alebo približne 6 % · x_i

R = 12 µg/l alebo približne 25 % · x_i

Červené víno = r = 6,4 µg/l alebo približne 8 % · x_i

R = 23 µg/l alebo približne 29 % · x_i

x_i = priemerná koncentrácia HCN vo víne

x_i = 48,4 µg/l v bielom víne

x_i = 80,5 µg/l v červenom víne.“

PRÍLOHA III

44.

STANOVENIE ETYLKARBAMÁTU VO VÍNE: SELEKTÍVNA DETEKČNÁ METÓDA POMOCOU PLYNOVEJ CHROMATOGRAFIE/HMOTNOSTNEJ SPEKTROMETRIE

(Použiteľné na stanovenie etylkarbamátu pri koncentráciách od 10 do 200 µg/l)

(*Upozornenie*: Dodržujte bezpečnostné opatrenia pre prácu s chemikáliami, etanolom, acetónom a karcinogénnymi produktmi (etylkarbamátom a dichlormetánom). Použité rozpúšťadlá riadne zneškodnite v súlade s platnými pravidlami ochrany životného prostredia).

A. **Princíp**

Do vzorky sa pridáva propylkarbamát ako vnútorný štandard, roztok sa riedi s vodou a umiestni sa do 50 ml extrakčnej kolóny s pevnou fázou. Etylkarbamát a propylkarbamát sa eluujú dichlormetánom.

Eluát sa koncentruje vo vákuovom rotačnom odparovači. Analýza koncentrátu sa vykonáva plynovou chromatografiou (PCh). Detekcia sa vykonáva hmotnostnou spektrometriou použitím fragmentometrie v režime SIM (selected ion monitoring – sledovanie vybraných iónov).

B. **Prístroje a chromatografické podmienky (príklad)**

a) Plynový chromatogram/hmotnostný spektrometer (PCh/HS) a, v prípade potreby, vzorka filtra a systém spracovania údajov alebo jeho ekvivalent

30 m (*) K kapilárna kolóna z kremíkového skla s vnútorným priemerom 0,25 mm, 0,25 µm Carbowax 20M

Prevádzka: vstrekovač 180 °C, vektor héliového plynu pri 1 ml/minúta pri 25°C, vstrekovanie nedelivou metódou

Teplotný program: 40 °C počas 0,75 minúty, potom zvyšovať rýchlosťou 10 °C za minútu na 60 °C, potom rýchlosťou 3 °C za minútu až na teplotu 150 °C (**), potom zvýšiť na 220 °C a udržať túto teplotu po dobu 4,25 minúty. Špecifická retenčná doba etylkarbamátu je od 23 do 27 minút, zatiaľ čo pre propylkarbamát je to od 27 do 31 minút.

Rozhranie plynového chromatogramu/spektrometra (PCh/HS): prevodné potrubie 220 °C. Parametre hmotnostného spektrometra manuálne prispôsobené perfluortributylamínom a optimalizované pre nižšiu hmotnostnú citlivosť, režim preberania SIM, 22 minút času pre zdržanie rozpúšťadla a začiatok preberania, doba zdržania/ión 100 ms.

b) Vákuový rotačný odparovač alebo zahusťovací systém podobný systému Kuderna Danish.

(*Poznámka:* Rýchlosť obnovy etylkarbamátu z testovanej vzorky C g) sa počas procesu musí pohybovať medzi 90 a 110 %.)

c) 300 ml hruškovitá banka s jedným zabrúseným hrdlom

d) 4 ml skúmavka na zahustenie so stupnicou, teflónovým spojom a zátkou.

C. **Činidlá**

a) Acetón – kvalita LC

(*Poznámka:* Pred použitím v PCh/HS každú dávku skontrolujte, či absentuje odozva na ióny s m/z 62, 74 a 89.)

b) Dichlormetán

(*Poznámka:* Pred použitím v PCh/HS po 200 násobnej koncentrácii každú dávku podrobte analýze, či absentuje odozva na ióny s m/z 62, 74 a 89.)

c) Etanol – bezvodý

(*) Pre niektoré zvlášť plné vína môže byť žiaduca 50 m kapilárna kolóna.
(**) Pre niektoré zvlášť plné vína môže byť žiaduci teplotný program 2 °C/min.

d) Štandardné roztoky etylkarbamátu (EK)

1. Zásobný roztok – 1,00 mg/ml. Odvážte 100 mg EK (čistota = 99 %) v 100 ml odmernej banke a zrieďte acetónom.

2. Štandardný pracovný roztok – 10,0 µg/ml. Preneste 1 ml zásobného roztoku do 100 ml odmernej banky a zrieďte acetónom až po značku.

e) Propylkarbamát (PK), štandardné roztoky

1. Zásobný roztok – 1,00 mg/ml. Odvážte 100 mg PK (vysoká kvalita činidla) v 100 ml odmernej banke a zrieďte acetónom až po značku.

2. Štandardný pracovný roztok – 10,0 µg/ml. Preneste 1 ml zásobného roztoku PK do 100 ml odmernej banky a zrieďte acetónom až po značku.

3. Vnútorný štandard roztoku PK – 400 ng/ml. Preneste 4 ml štandardného pracovného roztoku PK do 100 ml odmernej banky a zrieďte acetónom až po značku.

f) Štandardné kalibrované roztoky EK-PK

Zrieďte štandardný pracovný roztok EK d)2 a štandardný pracovný roztok PK e)2 dichlormetánom, aby ste získali:

1. (100 ng EK a 400 ng PK)/ml;
2. (200 ng EK a 400 ng PK)/ml;
3. (400 ng EK a 400 ng PK)/ml;
4. (800 ng EK a 400 ng PK)/ml;
5. (1 600 ng EK a 400 ng PK)/ml.

g) Testovaná vzorka – 100 ng EK/ml v 40 % etanole

Preneste 1 ml štandardného pracovného roztoku EK d)2 do 100 ml odmernej banky a zrieďte 40 % etanolom až po značku.

h) extrakčná kolóna s pevnou fázou – materiál na jedno použitie naplnený kremelinou, kapacita 50 ml

Poznámka: Pred analýzou skontrolujte každú dávku extrakčnej kolóny, či sa obnovujú EK a PK a absentuje odozva na ióny s m/z 62,74 a 89. Pripravte 100 ng EK/ml testovanej vzorky g). Analyzujte 5,00 ml testovanej vzorky, ako je opísané v častiach D a), E a F. Obnova 90 až 110 ng EK/ml je uspokojivá. Absorbčné činidlá, ktorých priemer častíc je nepravidelný, môžu spôsobiť pomalý tok a tak ovplyvniť obnovu EK a PK. Ak sa po niekoľkých pokusoch nezíska 90 až 110 % hodnoty testovanej vzorky, zmeňte kolónu alebo na určenie množstva EK použite opravenú kalibračnú krivku obnovy. Opravenú kalibračnú krivku získate, ak si pripravíte štandardné roztoky opísané v odseku f), ale namiesto dichlormetánu použijete 40 % etanol.

Analýza Analyzujte 1 ml štandardného kalibračného roztoku podľa opisu v častiach D, E a F.

Novú kalibračnú krivku vytvorte na základe pomeru EK/PK extrahovaných štandardov.

D. **Príprava testovanej vzorky**

Umiestnite nasledovné objemy testovaného materiálu do dvoch samostatných 100 ml kadičiek:

a) vína s obsahom alkoholu vyše 14 % obj.: 5,00 ± 0,01 ml;

b) vína s obsahom alkoholu najviac 14 % obj.: 20,00 ± 0,01 ml.

Do každej kadičky pridajte 1 ml roztok PK vnútorného štandardu C e)3 a vodu, aby ste získali celkový objem 40 ml (alebo 40 g).

E. **Extrakcia**

Extrakcia by mala byť vykonaná pod extrakčným krytom s primeranou ventiláciou.

Preneste vzorku pripravenú v časti D do extrakčnej kolóny.

Opláchnite kadičku s 10 ml vody a túto vodu preneste do kolóny.

Nechajte absorbovať tekutinu štyri minúty. Premyte ju 2 x 80 mililitrami dichlormetánu. Eluát zachyťte do 300 ml kužeľovitej banky.

Odparte eluát od 2 do 3 ml vo vodnom kúpeli rotačného odparovača pri teplote 30 °C. (*Poznámka*: Nedovoľte, aby došlo k vypareniu.)

Preneste koncentrovaný zvyšok Pasteurovou pipetou do 4 ml skúmavky so stupnicou.

Opláchnite banku s 1 ml dichlormetánu a túto tekutinu preneste do skúmavky. Vzorku zahustite (koncentrujte) na 1 ml pod slabých prúdom dusíka.

V prípade potreby preneste koncentrát do banky automatického vzorkovača na analýzu PCh/HS.

F. **Analýzy PCh/HS**

a) Kalibračná krivka

Do systému PCh/HS vstreknite 1 µl každého štandardného kalibračného roztoku z časti C f). Nakreslite graf pomeru plochy EK-PK, pričom odozva iónov bude na zvislej osi a množstvo EK v ng/ml na vodorovnej osi (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml).

b) Kvantifikácia EK

Do systému PCh/HS vstreknite 1 µl koncentrovaného extraktu pripraveného podľa časti E a vypočítajte pomer EK-PK pre ión s m/z 62. Pomocou kalibračnej krivky vnútorného štandardu stanovte koncentráciu EK (ng/ml) v extrakte. Vypočítajte koncentráciu EK v testovanej vzorke (ng/ml) tak, že množstvo EK (ng) v extrakte vydelíte objemom testovanej vzorky (ml).

c) Potvrdenie totožnosti EK

Stanovte, či sa odozvy na ióny s m/z 62, 74 a 89 objavujú v retenčnej dobe EK. Tieto odozvy sú typické pre hlavné fragmenty $(M\text{-}C_2H_2)^+$ a $(M\text{-}CH_3)^+$ a molekulový ión $(M)^+$. Prítomnosť EK sa potvrdzuje, ak relatívne pomery týchto iónov nepresahujú 20 % pomerov štandardu EK. Extrakt možno bude potrebné ďalej koncentrovať, aby došlo k dostatočnej odozve pre ión s m/z 89.

G. **Medzilaboratórna analýza**

Tabuľka udáva jednotlivé výsledky prakticky pripravenej vzorky a oboch typov vín.

Cochranov test eliminoval len jednu dvojicu výsledkov – pre víno s obsahom alkoholu vyše 14 % obj. a víno s obsahom do 14 % obj. z dvoch rôznych laboratórií.

Relatívna reprodukovateľnosť (RSD_R) má pri zvyšovaní koncentrácie etylkarbamátu klesajúcu tendenciu.

Uskutočnenie metódy stanovenia etylkarbamátu v alkoholických nápojoch pomocou PCh/HS

Vzorka	Zistený priemer EK (ng/ml)	Obnova pridaného EK (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Vína > 14 % obj.	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
Vína < 14 % obj.	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