31999R0761

L 99/4 *URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI* 14.4.1999

UREDBA KOMISIJE (ES) št. 761/1999
z dne 12. aprila 1999
o spremembi Uredbe (EGS) št. 2676/90 o določitvi metod Skupnosti za analizo vin

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Uredbe Sveta (EGS) št. 822/87 z dne 16. marca 1987 o skupni ureditvi trga za vino ([1]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (ES) št. 1627/98 ([2]), in zlasti člena 74 Uredbe,

ker Priloga k Uredbi Komisije (EGS) št. 2676/90 ([3]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (ES) št. 822/97 ([4]), opisuje metode analiz; ker se je metoda analize za D-jabolčno kislino, opisana v poglavju 20, izkazala za nenatančno in je bila razvita nova, natančnejša metoda; ker je bila razvita nova metoda za analizo derivatov cianida, ki je občutljivejša in enostavnejša za uporabo; ker je bila na mednarodni ravni izdelana nova metoda za določitev etilnega karbamata v vinu; ker so bile te tri metode potrjene v skladu z mednarodno priznanimi merili; ker uporaba teh metod lahko zagotovi boljši nadzor kakovosti in pristnosti vina ter prepreči spore zaradi uporabe zastarelih in nezanesljivih metod analize; ker je Mednarodni urad za trto in vino sprejel opis novih metod; ker je te metode treba vključiti v Uredbo;

ker so ukrepi, predvideni s to uredbo, v skladu z mnenjem Upravljalnega odbora za vino,

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Priloga k Uredbi (EGS) št. 2676/90 se spremeni:

1. poglavje 20 (D-jabolčna kislina) se nadomesti s Prilogo I k tej uredbi;
2. poglavje 38 (Derivati cianida) se nadomesti s Prilogo II k tej uredbi;
3. Priloga III k tej uredbi se doda kot poglavje 44.

Člen 2

Ta uredba začne veljati sedmi dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 12. aprila 1999

Za Komisijo
Franz FISCHLER
Član Komisije

([1]) UL L 84, 27.3.1987, str. 1.
([2]) UL L 210, 28.7.1998, str. 10.
([3]) UL L 272, 3.10.1990, str. 1.
([4]) UL L 117, 7.5.1997, str. 10.

PRILOGA I

20. **D-JABOLČNA KISLINA**

(encimska metoda)

1. PRINCIP

V prisotnosti D-malat dehidrogenaze (D-MDH) oksidira D-jabolčna kislina (D-malat) z nikotinamid adenin dinukleotidom (NAD) v oksalacetat. Nastali oksalacetat se razcepi v piruvat in ogljikov dioksid.

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

Količina nastalega NADH je sorazmerna s koncentracijo D-jabolčne kisline in se izmeri pri valovni dolžini 334, 340 ali 365 nm.

2. REAGENTI

Testna kombinacija za približno 30 določitev:

(a) stekleničkа 1 s približno 30 ml raztopine, ki vsebuje pufer Hepes [N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kislina] pH = 9,0 in stabilizatorje;

(b) stekleničkа 2 s približno 210 mg NAD liofilizata;

(c) tri stekleničke 3 z D-MDH liofilizatom, vsaka približno 8 enot.

Priprava raztopin

1. Vsebino stekleničke 1 uporabimo nerazredčeno. Pred uporabo raztopino segrejemo na temperaturo 20 do 25 °C.

2. Vsebino stekleničke 2 raztopimo v 4 ml dvakrat destilirane vode.

3. Raztopimo vsebino ene od stekleničk 3 v 0,6 ml dvakrat destilirane vode. Pred uporabo raztopino segrejemo na temperaturo 20 do 25 °C.

Stabilnost raztopin

Vsebina stekleničke 1 je stabilna najmanj eno leto, če je shranjena pri + 4 °C; raztopina 2 je stabilna tri tedne, če je shranjena pri + 4 °C, in dva meseca, če je shranjena pri −20 °C; raztopina 3 je stabilna pet dni, če je shranjena pri + 4 °C.

3. APARATURE

3.1 Spektrofotometer, ki omogoča meritve pri 340 nm, valovni dolžini, pri kateri je absorpcija NADH največja. Lahko pa se uporablja tudi spektrofotometer z nekontinuiranim spektrom, ki omogoča meritve pri 334 ali 365 nm. Ker merimo absolutno absorpcijo (ne uporabljamo umeritvenih raztopin, ampak upoštevamo ekstrakcijski koeficient NADH), je treba preveriti lestvice valovnih dolžin in spektralno absorpcijo opreme.

3.2 Steklene kivete z dolžino optične poti 1 cm (po potrebi se lahko uporabijo kivete za enkratno uporabo).

3.3 Mikropipete za pipetiranje prostornin v območju od 0,01 do 2 ml.

4. PRIPRAVA VZORCA

Analiza D-malata se običajno izvaja neposredno na vinu, brez predhodne odstranitve pigmentacije.

Količina D-malata v kiveti mora biti med 2 in 50 µg. Vino je treba zato razredčiti, da dobimo koncentracijo D-malata med 0,02 in 0,5 g/l ali med 0,02 in 0,3 g/l (odvisno od uporabljene aparature).

Tabela razredčitve:

Ocenjena količina D-malata/liter		Razredčitev z vodo	Faktor redčenja F
Merjeno pri:			
340 ali 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. POSTOPEK

S spektrofotometrom, naravnanim na valovno dolžino 340 nm, določimo absorpcijo na kivetah 1 cm, bodisi z uporabo zraka za določitev ničelne absorpcije (na poti žarka ni nobene kivete) bodisi z uporabo vode.

V kivete odpipetiramo:

	Referenčna	Testna
Raztopina 1	1,00 ml	1,00 ml
Raztopina 2	0,10 ml	0,10 ml
Dvakrat destilirana voda	1,80 ml	1,70 ml
Vzorec za meritev	–	0,10 ml

Zmešamo in po približno šestih minutah izmerimo absorpcijo referenčnih in testnih raztopin (A_1).

Dodamo:

	Referenčna	Testna
Raztopina 3	0,05 ml	0,05 ml

Zmešamo, počakamo do konca reakcije (približno 20 minut) in izmerimo absorpcijo referenčnih in testnih raztopin (A_2).

Izračunamo razliko absorpcij ($A_2 - A_1$) za referenčne (ΔA_T) in testne (ΔA_E) raztopine. Nazadnje izračunamo razliko med temi razlikami: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Opomba: Čas, ki je potreben, da se konča aktivnost encimov, se lahko od ene serije do druge razlikuje. Zgornji čas je samo napotek in ga je priporočljivo določiti za vsako posamezno serijo posebej.

D-jabolčna kislina reagira hitro. Encim razgradi tudi L-vinsko kislino, čeprav veliko počasneje. To pojasnjuje rahlo stransko reakcijo, ki jo lahko popravimo z ekstrapolacijo (glej Dodatek A).

6. NAVAJANJE REZULTATOV

Splošna formula za izračun koncentracije v mg/l je:

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

pri čemer je:

V = prostornina testne raztopine v ml (2,95 ml)

v = prostornina vzorca v ml (0,1 ml)

PM = molekulska masa snovi, ki jo določamo (za D-jabolčno kislino, PM = 134,09)

d = dolžina optične poti kivete v cm (1 cm)

ε = absorpcijski 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}).

Če je bil vzorec med pripravo razredčen, rezultat pomnožimo s faktorjem redčenja.

Koncentracija D-jabolčne kisline je dana v miligramih na liter (mg/l), zaokroženo na prvo celo število.

7. TOČNOST

Podrobnosti medlaboratorijskega preskusa točnosti metode so povzete v Dodatku B. Vrednosti, izvedene iz medlaboratorijskega preskusa, niso uporabne za nize analitskih koncentracij in matrik, razen tistih iz Dodatka B.

7.1 **Ponovljivost**

Absolutna razlika med dvema posameznima rezultatoma, pridobljenima v najkrajšem časovnem intervalu na identični snovi, ki jo je predložil operater za preskus z uporabo iste aparature, ne bo presegla vrednosti ponovljivosti r v več kakor 5 % primerov.

r = 11 mg/1.

7.2 **Obnovljivost**

Absolutna razlika med dvema posameznima rezultatoma, pridobljenima na identični snovi, predloženi za preskus v dveh različnih laboratorijih, ne bo presegla vrednosti obnovljivosti R v več kakor 5 % primerov.

R = 20 mg/1.

8. PRIPOMBE

Glede na stopnjo točnosti te metode je treba vrednosti D-jabolčne kisline, manjše od 50 mg/l, po potrebi potrditi z drugo analitsko metodo z uporabo drugega merilnega načina, kakršen je npr. princip Przyborskega et al. (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

Vzorec vina v kiveti ne sme presegati 0,1 ml, da bi se izognili morebitni inhibiciji aktivnosti encimov, ki bi jo povzročili polifenoli.

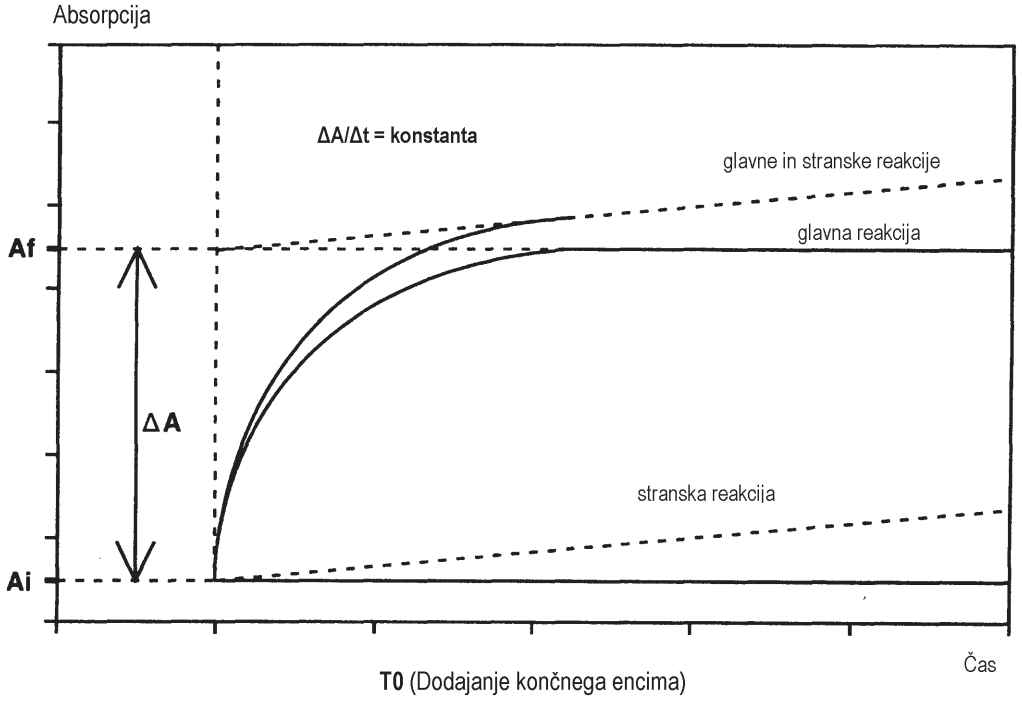
Dodatek A

Kako obravnavati stranske reakcije

Stranske reakcije so na splošno posledica sekundarnih reakcij encima na prisotnost drugih encimov v matriki vzorca ali medsebojnega učinkovanja enega ali več elementov matrike s kofaktorjem v encimski reakciji.

Pri normalni reakciji absorpcija doseže stalno vrednost po nekem času, običajno v 10 do 20 minutah, odvisno od hitrosti določene encimske reakcije. Vendar pa ob pojavu sekundarne reakcije absorpcija ne doseže stalne vrednosti, temveč se s časom redno povečuje. To vrsto procesa običajno imenujemo „stranska reakcija“.

Ob pojavu stranske reakcije je treba absorpcijo raztopine meriti v rednih presledkih (vsaki dve do pet minut) po poteku časa, ki je potreben, da standardna raztopina doseže končno absorpcijo. Če se absorpcija redno povečuje, je treba opraviti pet ali šest meritev in jih ekstrapolirati nazaj z uporabo grafa ali izračuna, da bi se določila absorpcija, ki bi bila ugotovljena, ko je bil dodan končni encim (T0). Koncentracija substrata se izračuna na podlagi razlike v absorpciji, ki je bila v tistem času ekstrapolirana (Af – Ai).



Slika 1: Stranska reakcija

Dodatek B

Statistični rezultati medlaboratorijskih preskusov

Leto medlaboratorijskega preskusa: 1995

Število laboratorijev: 8

Število vzorcev: 5 z dodajanjem D-jabolčne kisline

Vzorec	A	B	C	D	E
Število zadržanih laboratorijev po izločitvi tistih, ki so prikazali odklonske rezultate	7	8	7	8	7
Število laboratorijev, ki so prikazali odklonske rezultate	1	–	1	–	1
Število sprejetih rezultatov	35	41	35	41	36
Povprečna vrednost ($\overline{\chi}$)(mg/1)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Standardni odklon ponovljivosti (sr) (mg/1)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Relativni standardni odklon ponovljivosti (RSDr) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Meja ponovljivosti (r) (mg/1)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Standardni odklon obnovljivosti (sR) (mg/1)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Relativni standardni odklon obnovljivosti (RSDR) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Meja obnovljivosti (R) (mg/1)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Vrste vzorcev

A: rdeče vino; B: rdeče vino; C: belo vino; D: belo vino; E: belo vino;

PRILOGA II

„38. **DERIVATI CIANIDA**

(*Pozor*: upoštevamo varnostne ukrepe za ravnanje s kemikalijami kloraminom T, piridinom, kalijevim cianidom, klorovodikovo kislino in fosforno kislino. Uporabljene proizvode pravilno odstranimo, v skladu z veljavnimi okoljskimi predpisi. Pozorni moramo biti na cianovodikovo kislino, ki se sprosti med destilacijo dokisanega vina.)

1. PRINCIP

Celotna prosta cianovodikova kislina v vinu se sprosti s kislo hidrolizo in loči z destilacijo. Po reakciji s kloraminom-T in piridinom določimo nastali glutakon dialdehid s kolorometrijo na podlagi modrega obarvanja, ki ga daje z 1,3-dimetil-barbiturno kislino.

2. APARATURA

2.1 **Destilator**

Uporabljamo destilator, opisan za določanje vsebnosti alkohola v vinu.

2.2 Bučka 500-ml z okroglim dnom s standardiziranimi obrusi

2.3 Vodna kopel s termostatsko vzdrževano temperaturo 20 °C

2.4 Spektrofotometer, ki omogoča merjenje absorpcije pri valovni dolžini 590 nm

2.5 Steklene celice ali celice za enkratno uporabo z optično potjo 20 mm

3. REAGENTI

3.1 Fosforna kislina (H_3PO_4), 25 % (m/v)

3.2 Raztopina kloramina-T ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_20$) 3 % (m/v)

3.3 Raztopina 1,3-dimetil-barbiturne kisline: raztopimo 3,658 g 1,3-dimetil-barbiturne kisline ($C_6H_8N_2O_3$) v 15 ml piridina in 3 ml klorovodikove kisline (ρ_{20} = 1,19 g/ml) ter dodamo 50 ml destilirane vode.

3.4 Kalijev cianid (KCN)

3.5 Raztopina kalijevega jodida (KI), 10 % (m/v)

3.6 Raztopina srebrovega nitrata ($AgNO_3$), 0,1 M

4. POSTOPEK

4.1 **Destilacija**

V 500-ml bučko (2.2) damo 25 ml vina, 50 ml destilirane vode, 1 ml fosforne kisline (3.1) in nekaj steklenih kroglic. Bučko takoj položimo na destilator. Za vodenje destilata v 50-ml umerjeno bučko, ki vsebuje 10 ml vode, uporabimo koničasto cevko. Umerjeno bučko potopimo v ledeno vodo. V umerjeni bučki zberemo 30 do 35 ml destilata (ali približno 45 ml skupne količine).

Koničasto cevko kondenzatorja splaknemo z nekaj mililitri destilirane vode, destilat segrejemo na 20 °C in napolnimo z destilirano vodo do umeritvene črte.

4.2 **Meritev**

V 50-ml erlenmajerico z zamaškom iz motnega stekla damo 25 ml destilata, dodamo 1 ml raztopine kloramina-T (3.2) in jo zapremo z zamaškom. Po natanko 60 sekundah dodamo 3 ml raztopine 1,3-dimetil-barbiturne kisline (3.3), zapremo z zamaškom in pustimo 10 minut. Nato izmerimo absorpcijo v primerjavi s kontrolnim vzorcem (25 ml destilirane vode namesto 25 ml destilata) pri valovni dolžini 590 nm v celicah z optično potjo 20 mm.

5. IZRIS UMERITVENE KRIVULJE

5.1 **Argentometrična titracija kalijevega cianida**

V 300-ml umerjeni bučki raztopimo natančno izmerjenih 0,2 g KCN (3.4) v 100 ml destilirane vode. Dodamo 0,2 ml raztopine kalijevega jodida (3.5) in titriramo z 0,1 M raztopine srebrovega nitrata (3.6), dokler ne dobimo stabilnega rumenkastega obarvanja.

Z odvzemom 1 ml 0,1 M raztopine srebrovega nitrata, ki ustreza 13,2 mg KCN, izračunamo koncentracijo vzorca KCN.

5.2 **Umeritvena krivulja**

5.2.1 *Priprava standardne raztopine*

Po določitvi koncentracije KCN v skladu s postopkom, določenim v 5.1, pripravimo standardno raztopino, ki vsebuje 30 mg/l cianovodikove kisline (30 mg HCN 72,3 KCN). Raztopino razredčimo na 1/10.

V 100-ml umerjeno bučko nalijemo 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml in 5,0 ml raztopine razredčenega vzorca in dopolnimo z destilirano vodo do umeritvene črte. Pripravljene raztopine vsebujejo 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg in 150 µg cianovodikove kisline na liter.

5.2.2 *Titracija*

Vzamemo 25-ml vzorce tako pridobljenih raztopin in nadaljujemo, kakor je navedeno v 4.1 in 4.2.

Vrednosti, dobljene za absorpcijo za standardne raztopine kot funkcijo ustrezne vsebnosti cianovodikove kisline, potekajo linearno skozi koordinatno izhodišče.

6. NAVAJANJE REZULTATOV

Cianovodikova kislina je izražena v mikrogramih na liter (µg/l), zaokroženo na najbližje celo število.

6.1 **Izračun**

Vsebnost cianovodikove kisline odčitamo na umeritveni krivulji. Če je bil vzorec razredčen, rezultat pomnožimo s faktorjem redčenja.

Ponovljivost (r) in obnovljivost (R)

Belo vino = R = 3,1 µg/1 ali približno 6 % x_i

R = 12 µg/1 ali približno 25 % x_i

Rdeče vino = R = 6,4 µg/1 ali približno 8 % x_i

R = 23 µg/1 ali približno 29 % x_i

x_i = povprečna koncentracija HCN v vinu

x_i = 48,4 µg/1 za belo vino

x_i = 80,5 µg/1 za rdeče vino.“

PRILOGA III

44.

DOLOČITEV ETIL KARBAMATA V VINU: METODA SELEKTIVNEGA ODKRIVANJA Z UPORABO PLINSKE KROMATOGRAFIJE/MASNE SPEKTROMETRIJE

(Uporabna za določanje etil karbamata za koncentracije med 10 in 200 µg/1)

(*Pozor*: upoštevamo varnostne ukrepe za ravnanje s kemikalijami, etanolom, acetonom in karcinogenimi proizvodi (etil karbamatom in diklorometanom). Uporabljena topila pravilno odstranimo, v skladu z veljavnimi okoljskimi predpisi.)

A. **Princip**

Propil karbamat dodamo vzorcu kot interni standard, raztopino razredčimo z vodo in jo damo v 50-ml ekstrakcijsko kolono trdne faze. Etil karbamat in propil karbamat se izlužita z diklorometanom.

Izlužek se koncentrira v rotacijskem vakuumskem izparilniku. Koncentrat analiziramo s plinsko kromatografijo (PK). Odkrijemo ga z masno spektrometrijo z uporabo fragmentometrije v načinu SIO (spremljanje izbranih ionov).

B. **Aparatura in kromatografski pogoji (primer)**

(a) Plinski kromatogram/masni spektrometer (PK/MS) in po potrebi filter z vzorcem in sistem za obdelavo podatkov ali njuna ekvivalenta.

Kapilarna kolona iz zlitega silicijevega dioksida notranjega premera 30 m (*) x 0,25 mm, 0,25 µm carbowax 20M

Postopek: injektor 180 °C, helijev plinski vektor na 1 ml/minuto pri 25 °C, injiciranje z nerazcepno metodo

Nastavitev temperature: 40 °C 0,75 minute, nato narašča za 10 °C/minuto do 60 °C, nato za 3 °C/minuto do 150 °C (**), naraste na 220 °C in ohranja to temperaturo 4,25 minute. Specifičen retencijski čas za etil karbamat je med 23 in 27 minutami, za propil karbamat pa med 27 in 31 minutami.

Vmesna transferna linija plinskega kromatograma/spektrometra (PK/MS) 220 °C. Parametri masnega spektrometra ročno umerjeni s perfluorotributilaminom in optimizirani za manjšo masno senzibilnost, način pridobivanja SIO, zamik topila in začetni čas pridobivanja 22 minut, čas mirovanja/ion 100 ms.

(b) Rotacijski vakuumski izparilnik ali sistem koncentracije, podoben kuderna danish.

(*Opomba:* med procesom mora biti stopnja ponovne pridobitve etil karbamata iz testnega vzorca C(g) med 90 in 110 %.)

(c) Bučka – hruškaste oblike, 300 ml, enojen vrat

(d) Koncentracijska cevka – 4 ml, graduirana, s teflonskim obrusom in zamaškom

C. **Reagenti**

(a) Aceton – kakovost LC

(*Opomba:* preverimo vsako serijo pred uporabo v PK/MS glede odsotnosti odzivanja na ione m/z 62, 74 in 89.)

(b) Diklorometan

(*Opomba:* preverimo vsako serijo pred uporabo v PK/MS, po 200-kratni koncentraciji, glede odsotnosti odzivanja na m/z 62, 74 in 89 ione.)

(c) Etanol – brezvodni

(*) Za posamezna posebno bogata vina je zaželena kapilarna kolona 50 m.
(**) Za posamezna posebno bogata vina je zaželena nastavitev temperature na 2 °C/minuto.

(d) Standardne raztopine etil karbamata (EK)

1. Osnovna raztopina – 1,00 mg/ml. V 100-ml merilno bučko namerimo 100 mg EK (čistost 99 %) in razredčimo z acetonom.

2. Standardna delovna raztopina – 10,0 μg/ml. Prenesemo 1 ml osnovne EK raztopine v 100-ml merilno bučko in razredčimo z acetonom do oznake.

(e) Standardne raztopine propil karbamata (PK)

1. Osnovna raztopina – 1,00 mg/ml. Težka 100 mg PK (stopnja reagenta) v 100-ml merilni bučki in razredčena z acetonom do oznake.

2. Standardna delovna raztopina – 10,0 μg/ml. Prenesemo 1 ml osnovne PK raztopine v 100-ml merilno bučko in razredčimo z acetonom do oznake.

3. Interna standardna raztopina PK – 400 ng/ml. Prenesemo 4 ml standardne PK delovne raztopine v 100-ml merilno bučko in razredčimo z vodo do oznake.

(f) Standardne umerjene raztopine EK-PK

Razredčimo EK standardno delovno raztopino (d)(2) in PK standardno delovno raztopino (e)(2) z diklorometanom za pridobivanje:

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

(g) Testni vzorec – 100 ng EK/ml v 40 % etanola

Prenesemo 1 ml EK standardne delovne raztopine (d)(2) v 100-ml merilno bučko in razredčimo s 40 % etanolom do oznake.

(h) Ekstrakcijska kolona trdne faze – material za enkratno uporabo, predhodno napolnjen z zemljo, polno diatomej, kapaciteta 50 ml

Opomba: Pred analizo preverimo vsako serijo ekstrakcijskih kolon za ponovno pridobitev EK in PK ter glede odsotnosti odzivanja na ione 62, 74 in 89 m/z. Pripravimo 100 ng EK/ml testnega vzorca (g). Analiziramo 5,00 ml testnega vzorca, kakor je opisano v D(a), E in F. Ponovna pridobitev med 90 in 110 ng EK/ml je zadovoljiva. Absorbenti, ki imajo nepravilen premer delcev, lahko povzročijo počasen pretok, kar vpliva na ponovno pridobitev EK in PK. Če po več poskusih ne pridobimo med 90 in 110 % testnega vzorca, spremenimo kolono ali uporabimo popravljeno umeritveno krivuljo ponovne pridobitve za količinsko opredelitev EK. Da bi dobili popravljeno umeritveno krivuljo, pripravimo standardne raztopine, kakršne so opisane v (f), z uporabo 40- % etanola namesto diklorometana.

Analiziramo 1 ml standardne umeritvene raztopine, kakor je opisano v D, E in F.

Določimo novo umeritveno krivuljo z uporabo razmerja EK/PK ekstrahiranih standardov.

D. **Priprava testnega vzorca**

V dve ločeni 100-ml čaši damo naslednji količini testnega materiala:

(a) vina, ki imajo več kakor 14 % vol. alkohola: 5,00 ± 0,01 ml;

(b) vina, ki imajo največ 14 % vol. alkohola: 20,00 ± 0,01 ml.

V vsako čašo dodamo 1 ml interne standardne PK-raztopine C(e)(3) in vodo, da dobimo skupno prostornino 40 ml (ali 40 g).

E. **Ekstrakcija**

Ekstrakcijo je treba izvesti pod ekstraktorskim pokrovom, z ustreznim prezračevanjem.

Vzorec, pripravljen v skladu s postavko D v ekstrakcijski koloni.

Čašo izperemo z 10 ml vode in prenesemo vodo za izpiranje v kolono.

Pustimo tekočino, da se štiri minute absorbira. Izlužimo z 2 x 80 ml diklorometana. Izlužek zberemo v 300-ml erlenmajerici.

Izlužek odpareva od 2 do 3 ml v rotacijskem izparilniku z vodno kopeljo pri 30 °C. (*Opomba*: ne pustimo, da popolnoma izpari.)

S Pasteurovo pipeto prenesemo koncentrirani ostanek v 4-ml umerjeno cevko.

Erlenmajerico izperemo z 1 ml diklorometana in prenesemo tekočino za izpiranje v cevko. Koncentriramo vzorec na 1 ml z uporabo šibkega toka dušika.

Po potrebi prenesemo koncentrat v bučko za samodejno vzorčenje za PK/MS-analizo.

F. **PK/MS-analiza**

(a) Umeritvena krivulja

Vbrizgamo 1 µl vsake standardne umeritvene raztopine C(f) v PK/MS. Narišemo graf razmerja EK-PK območja za odziv iona m/z 62 na navpični osi in količino EK v ng/ml na vodoravni osi (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml).

(b) Količinska določitev EK

Vbrizgamo 1 µ1 koncentriranega ekstrakta, pripravljenega v skladu z E, v sistem EK-PK in izračunamo razmerje EK-PK območja za ion m/z 62. Ugotovimo koncentracijo EK (ng/ml) v ekstraktu z uporabo umeritvene krivulje za interni standard. Izračunamo koncentracijo EK v testnem vzorcu (ng/ml), tako da delimo količino EK (ng) v ekstraktu s prostornino testnega vzorca (ml).

(c) Potrditev čistosti EK

Preverimo, ali se med retencijo EK pojavijo odzivi na ione m/z 62, 74 in 89. Ti odzivi so značilnosti glavnih fragmentov $(M - C_2H_2)^+$ in $(M - CH_3)^+$ ter molekularnega iona $(M)^+$. Prisotnost EK je potrjena, če so relativna razmerja teh ionov v okviru 20 % EK-standarda. Ekstrakt je morda treba dodatno koncentrirati, da bi dobili zadosten odziv na ion m/z 89.

G. **Sodelovalna analiza**

Tabela prikazuje posamezne rezultate za vzorec s praktičnim prenosom in za oba tipa vina.

S Cochranovim testom je bil izločen le en par rezultatov iz dveh različnih laboratorijev za vino z alkoholno stopnjo, večjo od 14 %, in za vino z alkoholno stopnjo 14 % ali manj.

Relativna obnovljivost (RSD_R) se zmanjšuje z naraščanjem koncentracije etilnega karbamata.

Rezultati metode za določanje etilnega karbamata EK v alkoholnih pijačah s PK/MS

Vzorec	Povprečen ugotovljeni EK (ng/ml)	Ponovna pridobitev dodanega EK (%)	Sr	SR	RSDr (%)	RSDR (%)
Vina > 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
Vina 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