31999R0761

РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 761/1999 НА КОМИСИЯТА
от 12 април 1999 година
за изменение на Регламент (ЕИО) № 2676/90 относно определяне на методи на Общността за анализ на вината

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Регламент (ЕИО) № 822/87 на Съвета от 16 март 1987 г. относно общата организация на пазара на вино ([1]), последно изменен с Регламент (ЕО) № 1627/98 ([2]), и по-специално член 74 от него,

като има предвид, че приложението към Регламент (ЕИО) № 2676/90 на Комисията ([3]), последно изменен с Регламент (ЕО) № 822/97 ([4]), описва методи на анализ; като има предвид, че методът на анализ за D-ябълчна киселина, описан в глава 20, се е оказал донякъде неточен и че междувременно е развит нов, по-точен метод; като има предвид, че е развит нов метод на анализ за цианидни производни, който е по-чувствителен и по-лесен за приложение; като има предвид, че на международно ниво е развит нов метод за доказване наличието на етилкарбамат във виното; като има предвид, че тези три метода са утвърдени в съответствие с международно признати критерии; като има предвид, че използването на тези методи може да доведе до подобряване на контрола на качеството и автентичността на виното и да предотврати спорове, породени от прилагането на остарели и донякъде ненадеждни методи на анализ; като има предвид, че описанията на новите методи са одобрени от Международната организация по лозята и виното; като има предвид, че те трябва да бъдат включени в регламента;

като има предвид, че предвидените в настоящия регламент мерки са в съответствие със становището на Управителния комитет по виното,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Приложението към Регламент (ЕИО) № 2676/90 се изменя, както следва:

1. Глава 20 (Определяне на D-ябълчна киселина) се заменя с приложение I към настоящия регламент.
2. Глава 38 (Определяне на цианидни производни) се заменя с приложение II към настоящия регламент.
3. Приложение III към настоящия регламент се прибавя като глава 44.

Член 2

Настоящият регламент влиза в сила на седмия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейските общности*.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

Съставено в Брюксел на 12 април 1999 година.

За Комисията

Franz FISCHLER

Член на Комисията

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

ПРИЛОЖЕНИЕ I

„20. **ОПРЕДЕЛЯНЕ НА D-ЯБЪЛЧЕНА КИСЕЛИНА**

(ензимен метод)

1. ПРИНЦИП

В присъствието на D-малатдехидрогеназа (D-MDH) D-ябълчената киселина (D-малатът) се окислява от никотинамидадениндинуклеотид (NAD) до оксалацетат. Полученият оксалацетат се разпада на пируват и въглероден диоксид.

$$\text{D-малат} + \text{NAD}^+ \underset{\longleftarrow}{\overset{\text{D-MDH}}{\rightleftharpoons}} \text{пируват} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Количеството получен NADH е пропорционално на концентрацията на D-ябълчена киселина и се измерва при дължина на вълната 334, 340 или 265 nm.

2. РЕАГЕНТИ

Опитна комбинация за приблизително 30 изчисления:

а) бутилка № 1 с около 30 ml разтвор, състоящ се от буфер ХЕПЕС [N-(2-хидроксиетил)пиперазин-N′-2-етансулфонова киселина] pH = 9,0 и стабилизатори;

б) бутилка № 2 с около 210 mg NAD лиофилизат;

в) три бутилки № 3 с D-MDH лиофилизат, всяка около 8 U.

Приготвяне на разтворите

1. Използва се съдържанието на бутилка № 1, без да се разрежда. Преди употреба се разтворът се загрява до 20—25 °C.

2. Съдържанието на бутилка № 2 се разтваря в 4 ml двойно дестилирана вода.

3. Съдържанието на една от бутилките № 3 се разтваря в 0,6 ml двойно дестилирана вода. Преди употреба разтворът се загрява до 20—25 °C.

Стабилност на разтворите

Съдържанието на бутилка № 1 е стабилно в продължение на поне една година при съхранение на + 4 °C; разтвор № 2 е стабилен в продължение на три седмици при съхранение на + 4 °C и на два месеца при съхранение на – 20 °C; разтвор № 3 е стабилен в продължение на пет дни при съхранение на + 4 °C.

3. АПАРАТУРА

3.1. Спектрофотометър, позволяващ измерванията да бъдат правени при 340 nm — дължината на вълната, при която абсорбцията на NADH е максимална. Ако това е невъзможно, може да се използва спектрофотометър с прекъснат спектрален източник, позволяващ да се правят измервания на 334 или 365 nm. Тъй като трябва да се правят и измервания на абсолютната абсорбция (т.е. не се ползва поредица от калибровъчни разтвори, а се прави справка с коефициента на намаляване на NADH), скàлите на апарата за измерване на дължината на вълната и спектралната абсорбция трябва да бъдат проконтролирани.

3.2. Стъклени кювети с дължина на оптичния път 1 cm (по желание може да се използват кювети за еднократна употреба).

3.3. Микропипети за пипетиране на обеми в диапазона от 0,01 до 2 ml.

4. ПРИГОТВЯНЕ НА ПРОБАТА

Анализът на D-малат обикновено се провежда направо върху виното, без предварително обезцветяване.

Количеството D-малат в кюветата следва да бъде между 2 и 50 μg. Следователно виното трябва да бъде разредено, така че да даде концентрация на D-малат съответно между 0,02 и 0,5 g/l или 0,02 и 0,3 g/l (в зависимост от използваната апаратура).

Таблица на разреждането:

Приблизително количество D-малат/литър		Разреждане с вода	Фактор на разреждане F
Измерено при:			
340 или 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. ПРОЦЕДУРА

Със спектрофотометъра, нагласен на дължина на вълната 340 nm, се определя абсорбцията, като се използват кюветите от 1 cm, или чрез използване на въздух, за да се определи абсорбция „нула“ (без кювета в оптичния път), или на вода.

В кюветите се отпипетира:

	Референция	Опит
Разтвор № 1	1,00 ml	1,00 ml
Разтвор № 2	0,10 ml	0,10 ml
Двойно дестилирана вода	1,80 ml	1,70 ml
Проба за мярка	—	0,10 ml

Смесва се и след около шест минути се измерва абсорбцията на референтните разтвори на пробите (A_1).

Прибавя се:

	Референция	Опит
Разтвор № 3	0,05 ml	0,05 ml

Смесва се; изчаква се до приключване на реакцията (около 20 минути) и се измерва абсорбцията на разтворите за справка и на опитните разтвори (A_2).

Изчислява се абсорбционната разлика ($A_2 - A_1$) за референтните разтвори (ΔA_T) и за опитните разтвори (ΔA_E). Накрая се изчислява разликата между тези разлики: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Забележка: Времето, необходимо за приключване на ензимната активност, може да варира между различните поредици. Даденото по-горе време служи само за насока, така че е препоръчително то да се определя поотделно за всяка поредица.

D-ябълчената киселина реагира бързо. Ензимът преобразува и L-тартаровата киселина, но много по-бавно. Това обяснява леката странична реакция, която може да бъде коригирана чрез екстраполация (виж допълнение A).

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Общата формула за изчисляване концентрацията в mg/l е:

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

където:

V = обемът на опитния разтвор в ml (2,95 ml)

v = обемът на пробата в ml (0,1 ml)

PM = молекулна маса на веществото, чието наличие трябва да бъде установено (за D-ябълчната киселина PM = 134,09)

d = оптичен път на кюветата в cm (1 cm)

ε = абсорбционен коефициент на NADH:

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

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

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

Ако пробата е била разредена по време на приготвянето ѝ, резултатът се умножава по фактора на разреждане.

Концентрацията на D-ябълчената киселина е дадена в милиграми на литър (mg/l), без знаци след десетичната запетая.

7. ТОЧНОСТ

В допълнение Б са обобщени някои подробности за междулабораторното изпробване на точността на метода. Стойностите, получени при междулабораторното изпробване, могат да не бъдат приложими към аналитични концентрации и субстрати, различни от дадените в допълнение Б.

7.1. **Повторяемост**

Абсолютната разлика между два отделни резултата, получени при използването на еднакъв материал, подложен на опит от оператор, използващ същата апаратура, за най-краткия времеви интервал, не трябва да надхвърля стойността на повторяемост r в повече от 5 % от случаите.

r = 11 mg/l.

7.2. **Възпроизводимост**

Абсолютната разлика между два отделни резултата, получени при използването на еднакъв материал, подложен на опит в две различни лаборатории, не трябва да надхвърля стойността на възпроизводимост R в повече от 5 % от случаите.

R = 20 mg/l.

8. КОМЕНТАР

С оглед на степента на точност на описания метод стойности на D-ябълчна киселина под 50 mg/l следва при необходимост да бъдат потвърдени чрез друг аналитичен метод, с използване на друг принцип на измерване, като например този на Пшиборски *et al.* (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215—218. 1993).

Винената проба в кюветата не бива да надхвърля 0,1 ml, за да се избегне евентуално инхибиране на ензимната активност от полифеноли.

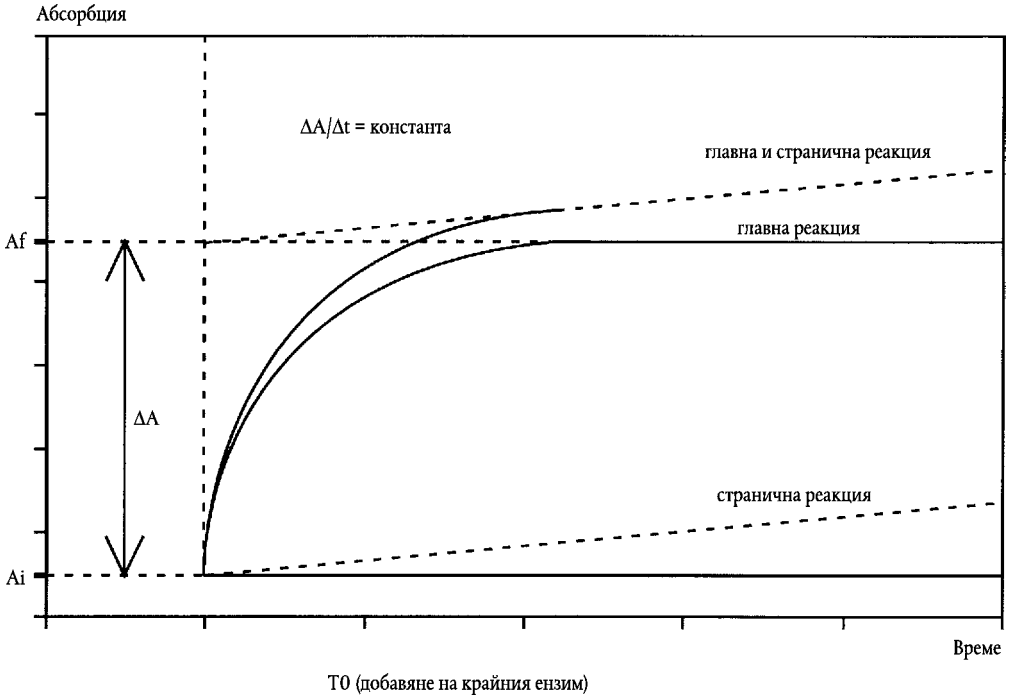
Допълнение A

Действие при странични реакции

Страничните реакции обикновено се дължат на вторични реакции на ензима, на наличието на други ензими в субстрата на пробата или на взаимодействие между един или повече елементи на субстрата с някой кофактор в ензимната реакция.

При нормалната реакция абсорбцията достига постоянна стойност след определено време — обикновено между 10 и 20 минути, в зависимост от скоростта на специфичната ензимна реакция. Когато обаче протичат и вторични реакции, абсорбцията не достига постоянна стойност, а с времето нараства равномерно. Този вид процес обикновено се означава като „странична реакция“.

Когато протича странична реакция, абсорбцията на разтвора следва да бъде измервана през равни интервали от време (на всеки 2—5 минути), след като е изтекло времето, необходимо на стандартния разтвор да достигне крайната си стойност на абсорбцията. Ако абсорбцията нараства равномерно, трябва да се направят 5—6 измервания, след което да се направи екстраполация чрез графика или изчисление, за да се определи абсорбцията, която би била наблюдавана при добавянето на крайния ензим (T0). Концентрацията на субстрата се изчислява на базата на разликата в абсорбцията, екстраполирана по това време (Af – Ai).



Фигура 1. Странична реакция

Допълнение Б

Статистически резултати от междулабораторния тест

Година на провеждане на теста: 1995 г.

Брой участвали лаборатории: 8

Брой на пробите: 5 с добавка на D-ябълчна киселина

Проба	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, получен след елиминиране на лабораториите, представили отклоняващи се от нормата резултати	7	8	7	8	7
Брой на лабораториите, представили отклоняващи се от нормата резултати	1	—	1	—	1
Брой на приетите резултати	35	41	35	41	36
Средна стойност ($\bar{\chi}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Стандартно отклонение на повторяемостта (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Относително стандартно отклонение на повторяемостта (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Граница на повторяемостта (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Относително стандартно отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Граница на възпроизводимостта (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Вид на пробите:

А: червено вино; Б: червено вино; В: бяло вино; Г: бяло вино; Д: бяло вино;“

ПРИЛОЖЕНИЕ II

„38. **ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА ЦИАНИДНИ ПРОИЗВОДНИ**

(Внимание: да се спазват мерките за безопасност при работа с химикалите хлорамин-Т, пиридин, калиев цианид, солна киселина и фосфорна киселина. Отстраняването на използваните продукти да става в съответствие с действащото законодателство по опазване на околната среда. Да се внимава с циановодородната киселина, отделяща се при дестилацията на подкислено вино.)

1. ПРИНЦИП

Общото количество свободна циановодородна киселина във виното се освобождава чрез киселинна хидролиза и се отделя чрез дестилация. След протичане на реакция с хлорамин-Т и пиридин, образувалият се глутакониев диалдехид се доказва чрез колориметрия на базата на синьото оцветяване, което той дава с 1,3-диметилбарбитурова киселина.

2. АПАРАТУРА

2.1. **Дестилационна апаратура**

Използва се описаната дестилационна апаратура за определяне на алкохолното съдържание на виното.

2.2. 500-милилитрова колба с кръгло дъно със стандартизирани шлифовани съединения.

2.3. Водна баня, термостатично поддържана на 20 °C.

2.4. Спектрофотометър, позволяващ абсорбцията да бъде измервана на дължина на вълната 590 nm.

2.5. Стъклени клетки или клетки за еднократна употреба с дължина на оптичния път 20 mm.

3. РЕАГЕНТИ

3.1. Фосфорна киселина (H_3PO_4) при 25 % (m/v).

3.2. Разтвор на хлорамин-Т ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$) 3 % (m/v).

3.3. Разтвор на 1,3-диметилбарбитурова киселина: разтварят се 3,658 g 1,3-диметилбарбитурова киселина ($C_6H_8N_2O_3$) в 15 ml пиридин и 3 ml солна киселина (ρ_{20} = 1,19 g/ml) и се добавят 50 ml дестилирана вода.

3.4. Калиев цианид (KCN).

3.5. Разтвор на калиев йодид (KI) 10 % (m/v).

3.6. Разтвор на сребърен нитрат ($AgNO_3$), 0,1 M.

4. ПРОЦЕДУРА

4.1. **Дестилация**

Сипват се 25 ml вино, 50 ml дестилирана вода, 1 ml солна киселина (3.1) и се добавят няколко стъклени маниста в 500-милилитровата колба (2.2). Колбата се слага веднага на дестилационната апаратура. С помощта на изтънена тръба дестилатът се отвежда в 50-милилитрова градуирана колба, съдържаща 10 ml вода. Градуираната колба се потапя в ледена вода. Събират се 30—35 ml от дестилата (или общо около 45 ml течност) в градуираната колба.

Промива се изтънената тръба на хладника с няколко милилитра дестилирана вода, дестилатът се загрява до 20 °C и се допълва с дестилирана вода до марката.

4.2. **Измерване**

Сипват се 25 ml от дестилата в 50-милилитрова конична колба с шлифована стъклена тапа, добавя се 1 ml разтвор на хлорамин-Т (3.2) и се запушва с тапата. Точно след 60 секунди се добавят 3 ml разтвор на 1,3-диметилбарбитурова киселина (3.3), запушва се с тапата и се оставя да престои 10 минути. След това се измерва абсорбцията, като се сравнява с контролен разтвор (25 ml дестилирана вода вместо 25 ml дестилат) при дължина на вълната 590 nm в кювети с дължина на оптичния път 20 mm.

5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КАЛИБРОВЪЧНАТА КРИВА

5.1. **Аргентометрично титруване на калиевия цианид**

Разтварят се около 0,2 g KCN (3.4), внимателно премерен, в 100 ml дестилирана вода в 300-милилитрова градуирана колба. Добавят се 0,2 ml разтвор на калиев йодид (3.5) и се титрува с 0,1 M разтвор на сребърен нитрат (3.6) до получаване на устойчиво жълтеникаво оцветяване.

Изчислява се концентрацията на пробата KCN, като се приема, че 1 ml 0,1 M разтвор на сребърен нитрат отговаря на 13,2 mg KCN.

5.2. **Стандартна крива**

5.2.1. *Приготвяне на стандартни разтвори*

След определянето на концентрацията на KCN съгласно процедурата, описана в 5.1, се приготвя стандартен разтвор, съдържащ 30 mg/l циановодородна киселина (30 mg HCN ≅ 72,3 mg KCN). Разтворът се разрежда до 1/10.

Отсипват се по 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml и 5,0 ml от разредения пробен разтвор в 100-милилитрови градуирани колби и се допълват с дестилирана вода до марката. Така приготвените разтвори съдържат съответно 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg и 150 µg циановодородна киселина на литър.

5.2.2. *Титруване*

Вземат се 25-милилитрови проби от така получените разтвори и се продължава съгласно инструкциите, дадени в 4.1 и 4.2 по-горе.

Стойностите, получени за абсорбцията, взети спрямо стандартните разтвори като функция на съответното съдържание на циановодородна киселина, следва да дават права, преминаваща през началото.

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Циановодородната киселина се изразява в микрограмове на литър (µg/l), без знаци след десетичната запетая.

6.1. **Метод на изчисление**

Съдържанието на циановодородната киселина се отчита по калибровъчната крива. Ако пробата е била разредена, резултатът се умножава по фактора на разреждане.

Повторяемост (r) и възпроизводимост (R)

Бяло вино = $r = 3{,}1$ µg/l или приблизително 6 %· x_i

$R = 12$ µg/l или приблизително 25 %· x_i

Червено вино = $r = 6{,}4$ µg/l или приблизително 6 %· x_i

$R = 23$ µg/l или приблизително 6 %· x_i

x_i = средна концентрация на HCN във виното

$x_i = 48{,}4$ µg/l за бяло вино

$x_i = 80{,}5$ µg/l за червено вино.“

ПРИЛОЖЕНИЕ III

44. **ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕТИЛКАРБАМАТ ВЪВ ВИНО: МЕТОД НА ИЗБИРАТЕЛНОТО ДЕТЕКТИРАНЕ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ/МАСОВА СПЕКТРОМЕТРИЯ**

(Приложим за доказването на етилкарбамат за концентрации между 10 и 200 µg/l)

(Внимание: да се спазват мерките за безопасност при работа с химикалите етанол, ацетон и канцерогенните материали (етилкарбамат и дихлорометан). Използваните разтворители да се отстраняват в съответствие с действащото законодателство за опазване на околната среда.)

А. **Принцип**

Взема се проба, в която се прибавя пропилкарбамат като вътрешен стандарт, разтворът се разрежда с вода и се поставя в 50-милилитрова колона за екстракция на твърдата фаза. Етилкарбаматът и пропилкарбаматът се елуират чрез дихлорометан.

Елуатът се изпарява във вакуумен ротационен изпарител. Така полученият концентрат се анализира чрез газова хроматография (GC). Детектирането става чрез масова спектрометрия, като се използва фрагментометрия в SIM режим (мониторинг на избрани йони).

Б. **Апаратура и хроматографски условия (пример)**

а) Газова хроматограма/масов спектрометър (GC/MS) и при необходимост филтър за пробите и система за обработка на данните или еквивалентна апаратура.

Кварцова капилярна колонка с вътрешен диаметър 30 m (*) × 0,25 mm, 0,25 µg Carbowax 20M.

Операция: инжектор 180 °C, хелиев вектор при 1 ml/минута при 25 °C, инжектиране чрез неразпръскващ метод.

График на температурата: 40 °C за 0,75 минути, след което се повишава с 10 °C/минута до достигане на 60 °C, след това с 3 °C/минута до достигане на 150 °C (**), повишава се до 220 °C и се поддържа в продължение на 4,25 минути. Специфичното време на задържане на за етилкарбамата е 23—27 минути, а за пропилкарбамата е 27—31 минути.

Интерфейс на газовата хроматограма/спектрометъра (GC/MS): линия на трансфера 220 °C. Параметрите на масовия спектрометър се нагласят ръчно с перфлуоротрибутиламин и се оптимизират за ниска масова чувствителност, режим на приемане SIM, време на забавяне на разтворителя и начало на приемането 22 минути, време на задържане/йон 100 ms.

б) Вакуумен ротационен изпарител или друга концентрираща система, сходна с Kuderna Danish.

(Внимание: степента на извличане на етилкарбамат от опитната проба, точка В, буква ж), трябва да бъде между 90 и 110 % по време на процеса.)

в) Колба — крушовидна, 300-милилитрова, еднократно шлифовано гърло.

г) Концентрационна тръба — 4-милилитрова, градуирана, със съединение с тефлоново покритие и запушалка.

В. **РЕАГЕНТИ**

а) Ацетон — качество LC

(Внимание: всяка партида да се проверява преди употреба в GC/MS за липса на ответна реакция за 62, 74 и 89 m/z йони.)

б) Дихлорометан

(Внимание: всяка партида да се анализира преди употреба в GC/MS след увеличение на концентрацията 200 пъти, за липса на ответна реакция за 62, 74 и 89 m/z йони.)

в) Етанол — безводен.

(*) За някои особено богати вина се предпочита капилярна колонка от 50 m.

(**) За някои особено богати вина се предпочита графика на температурата да е от 2 °C/минута.

г) Стандартни разтвори на етилкарбамат (EC)

1. Изходен разтвор — 1,00 mg/ml. Претеглят се 100 mg EC (с чистота ≥ 99 %) в 100-милилитрова обемна колба и се разреждат с ацетон до марката.

2. Стандартен работен разтвор — 10,0 µg/ml. Прехвърля се 1 ml от изходния разтвор на EC в 100-милилитрова обемна колба и се разрежда с ацетон до марката.

д) Стандартни разтвори на пропилкарбамат (PC)

1. Изходен разтвор — 1,00 mg/ml. Претеглят се 100 mg PC (химически чист) в 100-милилитрова обемна колба и се разрежда с ацетон до марката.

2. Стандартен работен разтвор — 10,0 µg/ml. Прехвърля се 1 ml от изходния разтвор на PC в 100-милилитрова обемна колба и се разрежда с ацетон до марката.

3. Разтвор на PC за вътрешен стандарт — 400 ng/ml. Прехвърлят се 4 ml от стандартния работен разтвор на PC в 100-милилитрова обемна колба и се разреждат с вода до марката.

е) Стандартни калибровъчни разтвори на EC—PC

Разреждат се с дихлорометан стандартният работен разтвор на EC, буква г), параграф 2, и стандартният работен разтвор на PC, буква д), параграф 2, така че да се получат:

1. (100 ng EC и 400 ng PC)/ml;

2. (200 ng EC и 400 ng PC)/ml;

3. (400 ng EC и 400 ng PC)/ml;

4. (800 ng EC и 400 ng PC)/ml;

5. (1600 ng EC и 400 ng PC)/ml.

ж) Опитна проба — 100 ng EC/ml в етанол 40 %.

Прехвърля се 1 ml от стандартния работен разтвор на EC, буква г), параграф 2, в 100-милилитрова обемна колба и се разрежда с етанол 40 % до марката.

з) Колона за екстракция на твърдата фаза — материал за еднократна употреба, предварително снабдена с инфузорна пръст, капацитет 50 ml.

Внимание: преди анализ да се проверява всяка партида колони за извличане на EC и PC и за липса на ответна реакция за 62, 74 и 89 m/z йони. Приготвят се 100 ng EC/ml от опитната проба, буква ж). Анализират се 5,00 ml от опитната проба, както е описано в точка Г, буква а) и точки Д и Е. Извличането на 90—110 ng EC/ml е задоволително. Абсорбенти с неправилен диаметър на частиците могат да доведат до забавяне на потока, което влияе на извличането на EC и PC. Ако след няколко опита не са получени 90—110 % от стойността на опитната проба, се сменя колоната или се използва коригирана калибровъчна крива на извличането, за да се определи EC количествено. За да се получи коригираната калибровъчна крива, се приготвят стандартни разтвори, както е описано в буква е), като се използва етанол 40 % вместо дихлорометан.

Анализира се 1 ml от стандартния калибровъчен разтвор, както е описано в точки Г, Д и Е.

Изготвя се нова калибровъчна крива, като се използва съотношението EC/PC от извлечените стандарти.

Г. ПРИГОТВЯНЕ НА ОПИТНАТА ПРОБА

Поставят се следните обеми от опитния материал в две отделни 100-милилитрови мензури:

а) вина, съдържащи над 14 об. % алкохол: 5,00 ± 0,01 ml;

б) вина, съдържащи максимум 14 об. % алкохол: 20,00 ± 0,01 ml.

Долива се във всяка мензура по 1 ml разтвор на PC за вътрешен стандарт, точка В, буква д), параграф 3, и вода, така че да се получи общ обем 40 ml (или 40 g).

Д. Екстракция

Екстракцията следва да се извършва в камина с подходяща вентилация.

Пробата, приготвена според инструкциите в точка Г, се прехвърля в колоната за екстракция.

Мензурата се изплаква с 10 ml вода и същата вода се прехвърля в колоната.

Течността се оставя да се абсорбира за четири минути. Елуира се с 2 × 80 ml дихлорометан. Елуатът се събира в 300-милилитрова конична колба.

Изпарява се елуатът от 2—3 ml в ротационен изпарител на водна баня при 30 °C.

(*Внимание:* да не се допуска течността да изври до дъно.)

Прехвърля се концентрираният остатък в 4-милилитрова градуирана тръба, като се използва пипета на Пастьор.

Колбата се изплаква с 1 ml дихлорометан и същата течност се прехвърля в тръбата. Пробата се концентрира до 1 ml под слаба струя азот.

При необходимост концентратът се прехвърля в колба за автоматично правене на проби за GC/MS анализ.

Е. **GC/MS АНАЛИЗ**

а) Калибровъчна крива

Инжектира се по 1 µl от всеки стандартен калибровъчен разтвор точка В, буква е) в GC/MS системата. Начертава се графиката на съотношението на областта EC—PC за 62 m/z йонна ответна реакция върху вертикалната ос и количеството EC в ng/ml върху хоризонталната ос (100, 200, 400, 800, 1600 ng/ml).

б) Количествено определяне на EC

Инжектира се 1 µl от концентрирания екстракт, приготвен съгласно точка Д, системата в GC/MS и се изчислява съотношението на областта EC—PC за 62 m/z йона. Определя се концентрацията на EC (ng/ml) в екстракта, като се използва калибровъчната крива на вътрешния стандарт. Изчислява се концентрацията на EC в опитната проба (ng/ml), като се разделя количеството EC (ng) в екстракта на обема на опитната проба (ml).

в) Потвърждаване на идентичността на EC

Определя се дали ответните реакции за 62, 74 и 89 m/z йони се появяват по време на периода на задържане на EC. Тези ответни реакции са признаци съответно на основните фрагменти $(M - C_2H_2)^+$ и $(M - CH_3)^+$ на молекулния йон $(M)^+$. Присъствието на EC се потвърждава, ако относителните съотношения на тези йони се вместват в 20 % от съотношенията за EC стандарта. Може да се наложи допълнително концентриране на екстракта с цел получаване на задоволителна ответна реакция за 89 m/z йона.

Ж. **СЪВМЕСТЕН АНАЛИЗ**

В таблицата са показани индивидуалните резултати от пробата с практическо улавяне и за двата вида вино.

Тестът на Кокран доведе до елиминирането само на една двойка резултати — за вина с алкохолно съдържание над 14 об. % и за вина с алкохолно съдържание 14 об. % или по-малко, дадени от две различни лаборатории.

Относителната възпроизводимост (RSD_R) има тенденцията да намалява с увеличаването на концентрацията на етилкарбамат.

Представяне на метода за доказване на етилкарбамат EC в алкохолни напитки чрез GC/MS

Проба	Средна стойност на откритите EC (ng/ml)	Извличане на добавените EC (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Вина > 14 об. %	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
Вина ≤ 14 об. %	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