31999R0761

14.4.1999 *JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE* L 99/4

REGULAMENTUL (CE) NR. 761/1999 AL COMISIEI
din 12 aprilie 1999
de modificare a Regulamentului (CEE) nr. 2676/90 de stabilire a metodelor comunitare de analiză a vinurilor

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Regulamentul (CEE) nr. 822/87 al Consiliului din 16 martie 1987 privind organizarea comună a pieței în sectorul vinurilor ([1]), astfel cum a fost modificat ultima dată prin Regulamentul (CE) nr. 1627/98 ([2]), în special articolul 74,

întrucât anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 ([3]) al Comisiei, astfel cum a fost modificat ultima dată prin Regulamentul (CE) nr. 822/97 ([4]), descrie metodele de analiză; întrucât metoda de analiză a acidului D-malic descrisă la capitolul 20 s-a dovedit a fi întrucâtva imprecisă, astfel încât s-a elaborat o nouă metodă, mai precisă; întrucât a fost elaborată o metodă nouă de analiză a derivaților cianurici, de mai mare finețe și mai ușor de aplicat; întrucât la nivel internațional a fost elaborată o metodă nouă de determinare a carbamatului de etil din vin; întrucât aceste trei metode au fost validate în conformitate cu criteriile recunoscute pe plan internațional; întrucât utilizarea acestor metode poate asigura un control îmbunătățit al calității și autenticității vinului și preîntâmpină litigiile datorate aplicării unor metode de analiză depășite și, într-o oarecare măsură, nefiabile; întrucât descrierile noilor metode au fost aprobate de Oficiul Internațional al Viței de Vie și Vinului; întrucât acestea trebuie să fie incorporate în regulament;

întrucât măsurile prevăzute de prezentul regulament sunt conforme cu avizul comitetului pentru gestionarea vinului,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 se modifică după cum urmează:

1. Capitolul 20 (acidul D-malic) se înlocuiește cu anexa I la prezentul regulament;
2. Capitolul 38 (derivații cianurici) se înlocuiește cu anexa II la prezentul regulament;
3. Anexa III la prezentul regulament se adaugă ca și capitol 44.

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a șaptea zi de la data publicării sale în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 12 aprilie 1999.

Pentru Comisie

Franz FISCHLER

Membru al Comisiei

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

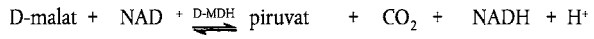
ANEXA I

„20. **ACIDUL D-MALIC**

(metoda enzimatică)

1. PRINCIPIUL

În prezența dehidrogenazei de D-malat (D-MDH), acidul D-malic (D-malatul) este oxidat de dinucleotida adenin-nicotinamidică (NAD) și formează un oxaloacetat. Oxaloacetatul format este descompus în piruvat și bioxid de carbon.



Cantitatea de NADH formată este proporțională cu concentrația de acid D-malic și se măsoară la o lungime de undă de 334, 340 sau 365 nm.

2. REACTIVII

Combinația de testare pentru circa 30 de determinări este următoarea:

(a) flaconul 1 cu circa 30 ml de soluție constând din soluție-tampon Hepes pH [acid N-(2-hidroxietilic)piperazinic-N′-2-etanosulfonic] = 9,0 și stabilizatori;

(b) flaconul 2 cu circa 210 mg de NAD liofilizat;

(c) trei flacoane 3 cu D-MDH liofilizat, fiecare de aproximativ 8 U.

Prepararea soluțiilor

1. Utilizați conținutul flaconului 1 nediluat. Înainte de utilizare aduceți soluția la o temperatură de 20-25 °C.

2. Dizolvați conținutul flaconului 2 în 4 ml de apă dublu distilată.

3. Dizolvați conținutul unuia din flacoanele 3 în 0,6 ml de apă dublu distilată. Înainte de utilizare aduceți soluția la o temperatură de 20-25 °C.

Stabilitatea soluțiilor

Conținutul flaconului 1 este stabil pentru cel puțin un an dacă este păstrat la + 4 °C; soluția 2 este stabilă trei săptămâni dacă este păstrată la + 4 °C, și timp de două luni dacă este păstrată la –20 °C; soluția 3 este stabilă cinci zile dacă este păstrată la + 4 °C.

3. APARATURA

3.1. Un spectrofotometru care permite efectuarea de măsurări la 340 nm, lungimea de undă la care absorbția NADH este maximă. În lipsa acestuia, se poate utiliza un spectrofotometru cu o sursă spectrală discontinuă, care permite efectuarea de măsurări la 334 sau 365 nm. Având în vedere că se efectuează măsurări ale absorbanței absolute (adică fără un set de soluții de calibrare, cu excepția referinței la coeficientul de stingere a NADH), trebuie să se verifice scalele lungimilor de undă și absorbanța spectrală a aparatului.

3.2. Cuve de sticlă cu lungimi ale drumului optic de 1 cm (se pot utiliza, după preferință, cuve recuperabile).

3.3. Micropipete pentru volume de picurare în gama 0,01-2 ml.

4. PREGĂTIREA PROBEI

De obicei, analiza D-malatului se efectuează direct pe vin, fără o decolorare prealabilă.

Cantitatea de D-malat din cuvă ar trebui să fie între 2 și 50 µg. Prin urmare, vinul trebuie să fie diluat pentru obținerea unei concentrații a D-malatului cuprinsă între 0,02 și 0,5 g/l sau 0,02 și respectiv 0,3 g/l (în funcție de aparatul utilizat).

Tabelul de diluție:

Cantitatea estimată de D-malat/litru		Diluare cu apă	Factorul de diluție F
Măsurată la:			
340 sau 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. PROCEDEUL

Cu spectrofotometrul reglat la o lungime de undă de 340 nm se determină absorbanța în cuve de 1 cm, utilizând fie aer pentru a regla absorbanța la zero (fără cuvă în drumul optic), fie apă.

În cuve se procedează la picurarea următoarelor:

	Referință	Analiză
Soluția 1	1,00 ml	1,00 ml
Soluția 2	0,10 ml	0,10 ml
Apă dublu-distilată	1,80 ml	1,70 ml
Probă pentru măsurare	—	0,10 ml

Amestecați și după circa șase minute măsurați absorbanța soluțiilor de referință și de testare (A_1).

Adăugați următoarele:

	Referință	Testare
Soluția 3	0,05 ml	0,05 ml

Amestecați; așteptați până când reacția este completă (aproximativ 20 de minute) și măsurați absorbanțele soluției de referință și soluției de testare (A_2).

Calculați diferența de absorbanță ($A_2 - A_1$) pentru soluția de referință (ΔA_T) și cea de testare (ΔA_E). În final se calculează diferența dintre aceste două valori: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Notă: Timpul necesar pentru terminarea activității enzimatice poate varia de la un lot la altul. Timpul precizat anterior este doar orientativ și se recomandă să fie determinat pentru fiecare lot.

Acidul D-malic reacționează rapid. Enzima transformă și acidul L-tartric, deși mult mai lent. Aceasta explică reacția secundară slabă, care poate fi corectată prin extrapolare (a se vedea apendicele A).

6. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Formula generală pentru calculul concentrației în mg/l este:

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

unde:

V = volumul soluției de testare în ml (2,95 ml)

v = volumul probei în ml (0,1 ml)

PM = masa moleculară a substanței care trebuie să fie determinată (pentru acidul D-malic, PM = 134,09)

d = drumul optic al cuvei în cm (1 cm)

ε = coeficientul de absorbție al NADH:

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

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

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

Dacă proba a fost diluată în timpul preparării, se multiplică rezultatul cu factorul de diluție.

Concentrația acidului D-malic se indică în miligrame pe litru (mg/l), fără zecimale.

7. PRECIZIA

Detaliile verificării între laboratoare privind precizia metodei sunt prezentate în Apendicele B. Valorile derivate din verificarea între laboratoare pot să nu fie aplicabile gamelor concentrației substanței analizate și matricelor altele decât cele menționate în apendicele B.

7.1. **Repetabilitatea**

Diferența absolută dintre două rezultate individuale obținute cu o substanță identică supusă verificării de un operator care utilizează aceeași aparatură, în cel mai scurt interval de timp, nu trebuie să depășească valoarea r a repetabilității, în mai mult de 5 % din cazuri.

r = 11 mg/l.

7.2. **Reproductibilitatea**

Diferența absolută dintre două rezultate individuale obținute cu o substanță identică supuse verificării în două laboratoare diferite nu trebuie să depășească valoarea reproductibilității R, în mai mult de 5 % din cazuri.

R = 20 mg/l.

8. OBSERVAȚII

Având în vedere gradul de precizie a acestei metode, valorile concentrației de acid D-malic sub 50 mg/l trebuie să fie confirmate, dacă este necesar, printr-o altă metodă analitică, utilizându-se un alt principiu de măsurare, cum ar fi cel al lui Przyborski *et al.* (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218, 1993).

Proba de vin din cuvă nu trebuie să depășească 0,1 ml pentru a se evita posibila inhibare a activității enzimatice de către polifenoli.

Apendicele A

Cum se tratează reacțiile secundare

Reacțiile secundare sunt în general datorate reacțiilor secundare ale enzimei, în prezența altor enzime în matricea probei sau la interacțiunea unuia sau mai multor elemente ale matricii cu un cofactor în reacția enzimatică.

La o reacție normală, absorbanța atinge o valoare constantă după un anumit timp, în general 10-20 de minute, în funcție de viteza reacției enzimatice specifice. Totuși, dacă au loc reacții secundare, absorbanța nu atinge o valoare constantă, ci crește în mod regulat cu timpul. Acest tip de proces este denumit în mod obișnuit «reacție secundară».

Dacă are loc o reacție secundară, absorbanța soluției se măsoară la intervale regulate (la fiecare 2-5 minute), după consumarea timpului necesar pentru ca soluția standard să atingă absorbanța finală. Dacă absorbanța crește regulat, se efectuează cinci sau șase măsurări, care se reextrapolează, pe baza unui grafic sau a unui calcul, în scopul determinării absorbanței observate în momentul adăugării enzimei finale (T0). Concentrația substratului se calculează în funcție de diferența absorbanței extrapolate în momentul respectiv (Af – Ai).

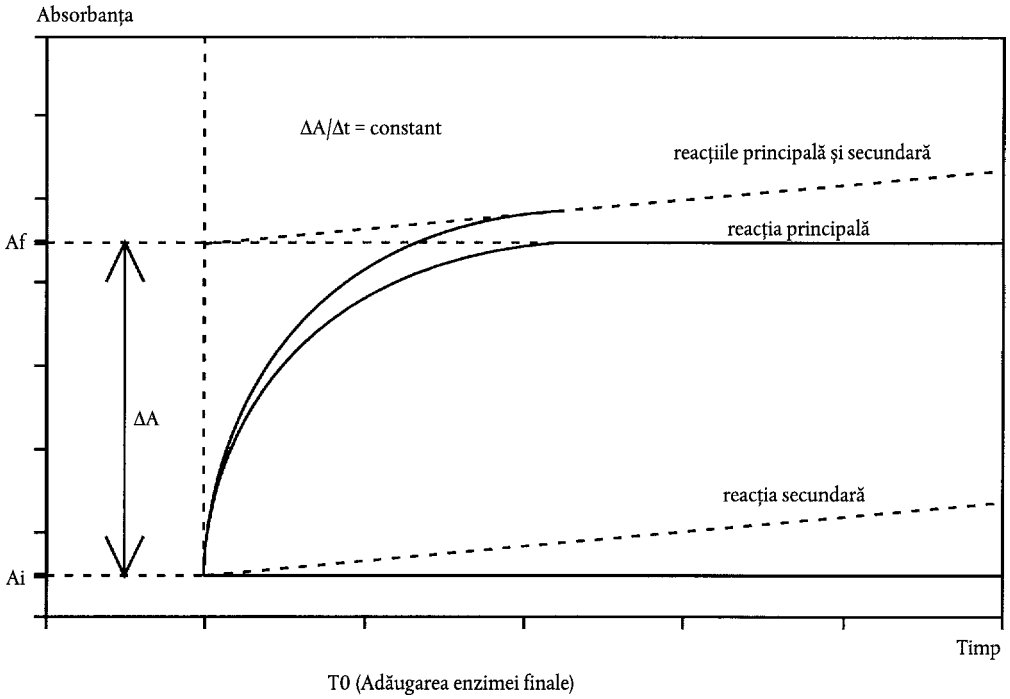


Figura 1. Reacția secundară

Apendicele B

Rezultatele statistice ale verificării între laboratoare

Anul verificării între laboratoare: 1995

Numărul de laboratoare: 8

Numărul de probe: 5 cu adaos de acid D-malic

Probă	A	B	C	D	E
Numărul de laboratoare selectate după eliminarea celor care au prezentat rezultate aberante	7	8	7	8	7
Numărul laboratoarelor care au prezentat rezultate aberante	1	—	1	—	1
Numărul rezultatelor acceptate	35	41	35	41	36
Valoarea medie ($\bar{x}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Deviația standard a repetabilității (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Deviația standard relativă a repetabilității (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Limita repetabilității (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Deviația standard a reproductibilității (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Deviația standard relativă a reproductibilității (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Limita reproductibilității (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Tipuri de probe:
A: vin roșu; B: vin roșu; C: vin alb; D: vin alb; E: vin alb;"

ANEXA II

„38. **DERIVAȚI CIANURICI**

(Atenție: Respectați măsurile de siguranță în manipularea următoarelor substanțe chimice: cloramina T, piridina, cianura de potasiu, acidul clorhidric și acidul fosforic. Eliminați în mod corespunzător produsele utilizate, în conformitate cu normele de protecție a mediului înconjurător în vigoare. Procedați cu precauție în manipularea acidului cianhidric degajat în timpul distilării vinului acidificat).

1. PRINCIPIUL

Acidul cianhidric liber total din vin este degajat prin hidroliză acidă și separat prin distilare. După ce reacționează cu cloramina T și piridina, dialdehida glutaconică formată este determinată prin colorimetrie, în funcție de coloritul albastru obținut în prezența acidului 1,3-dimetil-barbituric.

2. APARATURA

2.1. **Aparatul de distilare**

Se utilizează aparatul de distilare descris pentru determinarea conținutului de alcool al vinului

2.2. Retortă cu fund rotund de 500 ml și garnituri standardizate

2.3. Baie de apă reglată cu termostat la 20 °C

2.4. Spectrofotometru care permite măsurarea absorbanței la o lungime de undă de 590 nm

2.5. Celule de sticlă sau celule de unică folosință cu drumuri optice de 20 mm

3. REACTIVI

3.1. Acid fosforic (H_3PO_4) cu o concentrație de 25 % (m/v)

3.2. Soluție de cloramină T ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$) 3 % (m/v)

3.3. Soluție de acid 1,3-dimetil-barbituric: se dizolvă 3,658 g de acid 1,3-dimetil-barbituric ($C_6H_8N_2O_3$) în 15 ml de piridină și 3 ml de acid clorhidric (ρ_{20} = 1,19 g/ml) și se adaugă 50 ml de apă distilată

3.4. Cianură de potasiu (KCN)

3.5. Soluție de iodură de potasiu (KI) cu o concentrație de 10 % (m/v)

3.6. Soluție de nitrat de argint ($AgNO_3$) cu o concentrație de 0,1 M

4. PROCEDEUL

4.1. **Distilarea**

Puneți 25 ml de vin, 50 ml de apă distilată, 1 ml de acid fosforic (3.1) și câteva bile de sticlă într-o retortă de 500 ml (2.2). Așezați retorta imediat pe aparatul de distilare. Utilizați un tub conic pentru a dirija distilatul într-o retortă gradată de 50 ml, care conține 10 ml de apă. Scufundați retorta gradată în apă cu gheață. Colectați 30-35 ml de distilat (sau aproximativ 45 ml de lichid în total) în retorta gradată.

Spălați tubul conic al condensatorului cu câțiva mililitri de apă distilată, aduceți distilatul la 20 °C și umpleți cu apă distilată până la linia de calibrare.

4.2. **Măsurarea**

Puneți 25 ml de distilat într-o retortă conică de 50 ml cu dop de sticlă șlefuită, adăugați 1 ml de soluție de cloramină T (3.2) și etanșați cu dopul șlefuit. După exact 60 de secunde, adăugați 3 ml de soluție de acid 1,3-dimetil-barbituric, etanșați cu dopul șlefuit și lăsați timp de 10 minute. Apoi măsurați absorbanța cu un dispozitiv de control (25 ml de apă distilată în loc de 25 ml de distilat), la o lungime de undă de 590 nm în celule cu drumuri optice de 20 mm.

5. DETERMINAREA CURBEI DE CALIBRARE

5.1. **Titrarea argentometrică a cianurii de potasiu**

Dizolvați circa 0,2 g KCN (3.4), măsurate cu grijă, în 100 ml de apă distilată, într-o retortă gradată de 300 ml. Adăugați 0,2 ml soluție de iodură de potasiu (3.5) și titrați cu o soluție de nitrat de argint (3.6) de 0,1 M până se obține o colorație gălbuie stabilă.

Prelevați 1 ml soluție de nitrat de argint 0,1 M, care corespunde la 13,2 mg de KCN și calculați concentrația probei de KCN.

5.2. **Curba standard**

5.2.1. *Prepararea soluțiilor standard*

După stabilirea concentrației de KCN în conformitate cu procedeul prezentat la punctul 5.1, preparați o soluție standard, cu un conținut de 30 mg/l de acid cianhidric (30 mg HCN ≙ 72,3 mg KCN). Diluați soluția până la 1/10.

Introduceți 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml și 5,0 ml de soluție de testare diluată în retorte gradate de 100 ml și umpleți cu apă distilată până la linia de calibrare. Soluțiile preparate conțin respectiv 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg și 150 µg de acid cianhidric la litru.

5.2.2. *Titrarea*

Prelevați probe de 25 ml din soluțiile astfel obținute și continuați în conformitate cu instrucțiunile de la punctele 4.1 și 4.2 anterioare.

Valorile obținute pentru absorbanță, în raport cu soluțiile standard, în funcție de conținutul corespunzător de acid cianhidric, trebuie să producă o linie dreaptă care să treacă prin punctul zero.

6. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Acidul cianhidric este exprimat în micrograme la litru (µg/l), fără zecimale.

6.1. **Metoda de calcul**

Citiți conținutul de acid cianhidric pe curba de calibrare. Dacă s-a diluat proba, înmulțiți rezultatul cu factorul de diluție.

Repetabilitatea (r) și reproductibilitatea (R)

Vin alb = $r = 3{,}1$ µg/l sau aproximativ $6\ \% \cdot x_i$

$R = 12$ µg/l sau aproximativ $25\ \% \cdot x_i$

Vin roșu = $r = 6{,}4$ µg/l sau aproximativ $8\ \% \cdot x_i$

$R = 23$ µg/l sau aproximativ $25\ \% \cdot x_i$

x_i = concentrația medie de HCN a vinului

$x_i = 48{,}4$ µg/l pentru vinul alb

$x_i = 80{,}5$ µg/l pentru vinul roșu.”

ANEXA III

44. DETERMINAREA CARBAMATULUI DE ETIL DIN VIN: METODĂ DE DETECȚIE SELECTIVĂ, BAZATĂ PE UTILIZAREA CROMATOGRAFIEI CU GAZE/SPECTROMETRIEI DE MASĂ

(Aplicabilă determinării carbamatului de etil pentru concentrații de 10-200 µg/l)

(Atenție: Respectați măsurile de siguranță la manipularea substanțelor chimice, etanolului, acetonei și produselor carcinogene (carbamat de etil și diclormetan). Eliminați cu grijă solvenții utilizați, în conformitate cu normele de protecție a mediului înconjurător în vigoare).

A. **Principiul**

Adăugați carbamat de propil la o probă utilizată ca un etalon intern, diluați soluția cu apă și introduceți-o într-o coloană de extracție cu fază solidă de 50 ml. Carbamatul de etil și carbamatul de propil se eluează cu diclormetan.

Eluatul se concentrează într-un evaporator rotativ sub vid. Concentratul este analizat prin cromatografie cu gaze (CG). Detecția se face prin spectrometrie de masă, utilizând fragmentometria în modul MIS (monitorizarea ionilor selectați).

B. **Aparatura și condițiile cromatografice (exemplu)**

(a) O cromatogramă cu gaze/un spectrometru de masă (CG/SM) și, dacă este necesar, un filtru de prelevare de probe și un sistem de prelucrare a datelor sau ceva echivalent

O coloană capilară din silice topită cu diametrul interior de 30 m (*) × 0,25 mm, 0,25 µm Carbowax 20M

Funcționare: injector la 180 °C, heliu gazos ca vector cu un debit de 1 ml/minut la 25 °C, injecție prin metoda fără scindare

Gama de temperatură: 40 °C timp de 0,75 minute, creștere ulterioară cu 10 °C/minut până la 60 °C, apoi cu 3 °C/minut până la 150 °C (**), creștere până la 220 °C și menținerea temperaturii respective timp de 4,25 minute. Timpul de retenție specific pentru carbamatul de etil este între 23 și 27 minute iar cel pentru carbamatul de propil este între 27 și 31 minute.

Interfață cromatogramă de gaze/spectrometru (CG/SM): linie de transfer la 220 °C. Parametrii spectrometrului de masă se reglează manual cu tributilamină complet fluorurată și se optimizează pentru o sensibilitate mai redusă a masei, un mod de achiziție a datelor MIS, un timp de încetinire a solventului și de declanșare a achiziției datelor de 22 minute, un timp de așteptare/ion de 100 ms.

(b) Evaporator rotativ sub vid sau un sistem de concentrare similar cu Kuderna Danish.

(NB: gradul de recuperare a carbamatului de etil din proba de testare C(g) trebuie să fie între 90 și 110 % în cursul procesului).

(c) Retortă în formă de pară de 300 ml, cu gât din sticlă șlefuită.

(d) Tub de concentrare de 4 ml, gradat, cu garnitură teflonată și dop de plută.

C. **Reactivi**

(a) Acetonă de calitate CL

(NB: Verificați fiecare lot înaintea utilizării în CG/SM, în ceea ce privește absența răspunsului pentru ionii de 62, 74 și 89 m/z).

(b) Diclormetan

(NB: Analizați fiecare lot înaintea utilizării în CG/SM după o concentrare de 200 de ori, pentru a verifica absența răspunsului pentru ionii de 62, 74 și 89 m/z).

(c) Etanol anhidru

(*) Pentru anumite vinuri deosebit de consistente, se recomandă o coloană capilară de 50 m.

(**) Pentru anumite vinuri deosebit de consistente, se recomandă o gamă de temperatură de 2 °C/min.

(d) Soluții etalon de carbamat de etil (CE)

1. Soluție-mamă – 1,00 mg/ml. Cântăriți 100 mg de CE (puritate ≥ 99 %) într-o retortă gradată de 100 ml și diluați cu acetonă.

2. Soluție de lucru etalon – 10,0 µg/ml. Transvazați 1 ml din soluția-mamă de CE într-o retortă gradată de 100 ml și diluați cu acetonă până la nivel.

(e) Soluții etalon de carbamat de propil (CP)

1. Soluție-mamă – 1,00 mg/ml. Cântăriți 100 mg de CP (calitate de reactiv) într-o retortă gradată de 100 ml și diluați cu acetonă până la nivel.

2. Soluție de lucru etalon – 10,0 µg/ml. Transvazați 1 ml din soluția-mamă de CP într-o retortă gradată de 100 ml și diluați cu acetonă până la nivel.

3. Soluție etalon intern de CP – 400 ng/ml. Transvazați 4 ml din soluția de lucru etalon de CP într-o retortă gradată de 100 ml și diluați cu apă până la nivel.

(f) Soluții etalon calibrate de CE-CP

Diluați soluția de lucru etalon CE (d)(2) și soluția de lucru etalon de CP (e)(2) cu diclormetan pentru a obține:

1. (100 ng de CE și 400 ng de CP)/ml;

2. (200 ng de CE și 400 ng de CP)/ml;

3. (400 ng de CE și 400 ng de CP)/ml;

4. (800 ng de CE și 400 ng de CP)/ml;

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

(g) Probă de testare – 100 ng de CE/ml în etanol 40 %

Transvazați 1 ml din soluția de lucru etalon de CE (d)(2) într-o retortă gradată de 100 ml și diluați cu etanol 40 % până la nivel.

(h) Coloană de extracție cu fază solidă – material recuperabil, preambalat cu diatomit, capacitate 50 ml

NB: Înainte de analiză, verificați fiecare lot din coloanele de extracție pentru recuperarea CE și CP și absența răspunsului pentru ionii de 62, 74 și 89 m/z. Preparați 100 ng de CE/ml din proba de testare (g). Analizați 5,00 ml din proba de testare conform indicațiilor de la D (a), E și F. Recuperarea a 90 până la 110 ng de CE/ml este satisfăcătoare. Absorbanții care au particule cu un diametru neregulat pot cauza o curgere mai lentă, care afectează recuperarea CE și CP. Dacă nu obțineți un procent de 90 până la 110 % din valoarea probei de testare după câteva teste, schimbați coloana sau utilizați o curbă calibrată și corectată a recuperării pentru cuantificarea CE. Pentru a obține curba de calibrare corectată, preparați soluțiile etalon conform instrucțiunilor de la litera (f), utilizând etanol 40 % în locul diclormetanului.

Analizați 1 ml din soluția de calibrare etalon conform instrucțiunilor de la secțiunile D, E și F.

Stabiliți o nouă curbă de calibrare prin utilizarea raportului CE/CP din etaloanele extrase.

D. **Pregătirea probei de testare**

Introduceți următoarele volume din materialul de testare în două pahare de laborator distincte, de 100 ml:

(a) vinuri cu un conținut de peste 14 % vol alcool: 5,00 ± 0,01 ml;

(b) vinuri cu un conținut de maximum 14 % vol alcool: 20,00 ± 0,01 ml.

Adăugați în fiecare pahar 1 ml din soluția etalon intern CP C(e)(3) și apă pentru a obține un volum total de 40 ml (sau 40 g).

E. **Extracția**

Extracția se efectuează sub o hotă de extracție, ventilată corespunzător.

Transvazați proba pregătită conform secțiunii D în coloana de extracție.

Spălați paharul cu 10 ml de apă și transvazați apa de spălare în coloană.

Lăsați lichidul să fie absorbit timp de patru minute. Faceți eluarea cu 2 × 80 ml diclormetan. Colectați eluatul într-o retortă conică de 300 ml.

Evaporați 2 până la 3 ml de eluat într-un evaporator rotativ cu baie de apă la 30 °C.

(*NB:* nu lăsați să fiarbă până la uscare).

Transvazați reziduul concentrat într-un tub gradat de 4 ml cu o pipetă Pasteur.

Spălați retorta cu 1 ml de diclormetan și transvazați lichidul de spălare în tub. Concentrați proba până la 1 ml într-o soluție slabă de azot.

Dacă este necesar, transvazați concentratul în retorta aparatului de prelevare de probe automat pentru analiza CG/SM.

F. **Analiza CG/SM**

(a) Curba de calibrare

Injectați 1 µl din fiecare soluție etalon de calibrare C(f) în CG/SM. Trasați graficul raportului dintre suprafețele CE-CP, la un răspuns ionic de 62 m/z pe axa verticală și cantitatea de CE în ng/ml pe axa orizontală (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml).

(b) Cuantificarea CE

Injectați 1 µl de extract concentrat preparat conform secțiunii E în sistemul CG/SM și calculați raportul suprafețelor CE-CP la răspunsul ionic de 62 m/z. Stabiliți concentrația de CE din extract (în ng/ml), utilizând curba de calibrare etalon intern. Calculați concentrația de CE din proba de testare (în ng/ml), împărțind cantitatea de CE (ng) din extract la volumul probei de testare (în ml).

(c) Confirmarea identității CE

Stabiliți dacă în cursul perioadei de retenție a CE apar răspunsurile ionilor de 62, 74 și 89 m/z. Aceste răspunsuri sunt caracteristici ale fragmentelor principale $(M - C_2H_2)^+$ și $(M - CH_3)^+$ și respectiv ale ionului molecular $(M)^+$. Prezența CE este confirmată, dacă rapoartele relative ale acestor ioni se situează în limita a 20 % din rapoartele pentru un etalon CE. Este posibil ca extractul să necesite o concentrație suplimentară, în scopul obținerii unui răspuns suficient pentru ionul de 89 m/z.

G. **Analiza comparativă**

Tabelul prezintă rezultatele individuale pentru probele utilizate în evaporări practice și pentru ambele tipuri de vinuri.

Testul Cochran a dus la eliminarea unei singure perechi de rezultate, în cazul vinului cu tărie alcoolică de peste 14 % vol și vinului cu tărie alcoolică de 14 % vol sau mai puțin, provenit de la două laboratoare diferite.

Reproductibilitatea relativă (RSD_R) tinde să scadă pe măsură ce concentrația de carbamat de etil crește.

Performanța metodei de determinare a carbamatului de etil CE din băuturile alcoolice prin utilizarea CG/SM

Probă	Media CE constatată (ng/ml)	Recuperarea CE-ului adăugat (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Vinuri > 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
Vinuri ≤ 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