

31999R0761

L 99/4

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

14.4.1999

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 761/1999**ze dne 12. dubna 1999,****kterým se mění nařízení (EHS) č. 2676/90, kterým se stanoví metody Společenství používané pro rozbor vín**

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na nařízení Rady (EHS) č. 822/87 ze dne 16. března 1987 o společné organizaci trhu s vínem ⁽¹⁾, naposledy pozměněné nařízením (ES) č. 1627/98 ⁽²⁾, a zejména na článek 74 uvedeného nařízení,

vzhledem k tomu, že nařízení Komise (EHS) č. 2676/90 ⁽³⁾ naposledy pozměněné nařízením (ES) č. 822/97 ⁽⁴⁾ popisuje v příloze metody rozboru; že metoda rozboru pro kyselinu D-jablečnou popsaná v kapitole 20 se ukázala poněkud nepřesnou a byla vyvinuta nová přesnější metoda; že pro rozbor derivátů kyanidů byla vyvinuta nová přesnější metoda, která je citlivější a pro použití snadnější; že na mezinárodní úrovni byla vyvinuta nová metoda pro stanovení ethyl-karbamátu ve víně; že tyto tři metody byly potvrzeny v souladu s mezinárodně uznávanými kritérii; že použití těchto metod může zabezpečit lepší kontrolu jakosti a pravosti vína a zabránit sporům vyplývajícím z použití zastaralých a poněkud nespolehlivých metod rozboru; že popisy těchto nových metod byly schváleny Mezinárodním úřadem pro révu a víno; že tuto metodu je třeba doplnit do uvedeného nařízení;

vzhledem k tomu, že opatření tohoto nařízení jsou v souladu se stanoviskem Řídícího výboru pro víno,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Příloha k nařízení (EHS) č. 2676/90 se mění takto:

1. Kapitola 20 (Kyselina D-jablečná) se nahrazuje přílohou I tohoto nařízení.
2. Kapitola 38 (Deriváty kyanidů) se nahrazuje přílohou II tohoto nařízení.
3. Příloha III tohoto nařízení se doplňuje jako kapitola 44.

*Článek 2*Toto nařízení vstupuje v platnost sedmým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 12. dubna 1999.

Za Komisi
Franz FISCHLER
člen Komise

⁽¹⁾ Úř. věst. L 84, 27.3.1987, s. 1.⁽²⁾ Úř. věst. L 210, 28.7.1998, s. 10.⁽³⁾ Úř. věst. L 272, 3.10.1990, s. 1.⁽⁴⁾ Úř. věst. L 117, 7.5.1997, s. 10.

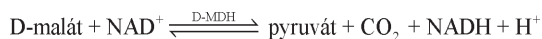
PŘÍLOHA I

„20. KYSELINA D-JABLEČNÁ

(enzymatická metoda)

1. PRINCIP

V přítomnosti D-malát-dehydrogenasy (D-MDH) se kyselina D-jablečná (D-malát) oxiduje nikotinamidadenindinukleotidem (NAD) na oxalocetan. Vytvořený oxalocetan se štěpí na pyruvát a oxid uhličitý.



Množství vytvořeného NADH je úměrné obsahu kyseliny D-jablečné a měří se při vlnové délce 334, 340 nebo 365 nm.

2. ČINIDLA

Zkušební sada pro přibližně 30 stanovení:

- a) lahvička 1 s asi 30 ml roztoku skládajícího se z tlumivého roztoku Hepes [N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonové kyseliny] pH = 9,0 a stabilizátorů;
- b) lahvička 2 s asi 210 mg NAD lyofilizátu;
- c) tři lahvičky 3 s D-MDH lyofilizátem, každá asi 8 U.

Příprava roztoků

1. Obsah lahvičky 1 použijte nezředěný. Před použitím roztok uveďte na teplotu 20 až 25 °C.
2. Obsah lahvičky 2 rozpusťte ve 4 ml redestilované vody.
3. Obsah jedné z lahviček 3 rozpusťte v 0,6 ml redestilované vody. Před použitím roztok uveďte na teplotu 20 až 25 °C.

Stabilita roztoků

Obsah lahvičky 1 je stabilní alespoň po dobu jednoho roku, pokud je uložen při +4 °C; roztok 2 je stabilní po dobu tří týdnů, pokud je uložen tři týdny při +4 °C a po dobu dvou měsíců při uložení při -20 °C; roztok 3 je stabilní po dobu tří měsíců, pokud je uložen při +4 °C.

3. VYBAVENÍ

- 3.1. Spektrofotometr, který umožňuje měření při vlnové délce 340 nm, při které je absorpce NADH na maximální hodnotě. Pokud není k dispozici, lze použít spektrofotometr se zdrojem nespojitého spektra, který umožňuje provádět měření při 334 nebo 365 nm. Jelikož se jedná o měření absolutní absorpce (tj. bez sady kalibračních roztoků, ale s odkazem na extinkční koeficient NADH), je nutné zkontrolovat stupnici vlnových délek a spektrální absorpční přístroje.
- 3.2. Skleněné kyvety s délkou optické dráhy 1 cm (v případě, že dáváte přednost kyvetám na jedno použití, je možné používat tyto).
- 3.3. Mikropipety pro pipetování objemů v rozsahu od 0,01 do 2 ml.

4. PŘÍPRAVA VZORKU

Stanovení D-malátu se obvykle provádí přímo na víně bez předběžného odbarvení.

Množství D-malátu v kyvetě by mělo být mezi 2 a 50 µg. Víno proto musí být naředěno tak, aby dávalo koncentraci D-malátu mezi 0,02 a 0,5 g/l případně 0,02 až 0,3 g/l (v závislosti na použitém přístroji).

Tabulka zředění:

Odhadované množství D-malátu/litr		Zředění vodou	Faktor zředění F
Měřeno při			
340 nebo 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

Se spektrofotometrem nastaveným pro vlnovou délku 340 nm určete absorbanci pomocí kyvet 1 cm a buď použijte k nastavení nulové absorpance vzduch (bez kyvet v optické dráze) nebo použijte vodu.

Do kyvety pipetujte:

	Reference	Test
Roztok 1	1,00 ml	1,00 ml
Roztok 2	0,10 ml	0,10 ml
Redestilovaná voda	1,80 ml	1,70 ml
Vzorek pro měření	—	0,10 ml

Promíchejte a asi po šesti minutách změřte absorbanci referenčního a zkušebního roztoku (A_1).

Přidejte:

	Reference	Test
Roztok 3	0,05 ml	0,05 ml

Promíchejte, po dokončení reakce (přibližně 20 minut) změřte absorbanci referenčního a zkušebního roztoku (A_2).

Vypočítejte rozdíl absorpance ($A_2 - A_1$) pro referenční roztok (ΔA_r) a zkušební roztok (ΔA_e). Nakonec vypočítejte rozdíl mezi těmito rozdíly $\Delta A = \Delta A_e - \Delta A_r$.

Poznámka: Doba potřebná pro dokončení enzymové aktivity se může měnit od dávky k dávce. Doba uvedená výše je dána jen jako vodítko a doporučuje se ji stanovit pro každou dávku.

Kyselina D-jablečná reaguje prudce. Enzym také převádí kyselinu L-vinnou, avšak mnohem pomaleji. To vysvětluje mírnou vedlejší reakci, což lze napravit pomocí extrapolace (viz dodatek A).

6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Obecný vzorec pro vypočítání obsahu v mg/l je:

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

kde:

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

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

PM = molekulová hmotnost stanovované látky (pro kyselinu D-jablečnou je PM = 134,09)

d = optická dráha kyvety v cm (1 cm)

ϵ = absorpční koeficient NADH

při 340 nm = 6,3 (l mmol⁻¹ cm⁻¹)

při 365 nm = 3,4 (l mmol⁻¹ cm⁻¹)

při 334 nm = 6,18 (l mmol⁻¹ cm⁻¹)

Pokud bylo během přípravy vzorku provedeno zředění, musí se výsledek vynásobit faktorem zředění.

Obsah kyseliny D-jablečné se uvádí v miligramech na litr (mg/l) bez desetinných míst.

7. PŘESNOST

Podrobnosti o mezilaboratorní zkoušce na přesnost metody jsou shrnuty v dodatku B. Hodnoty odvozené z mezilaboratorní zkoušky mohou být nepoužitelné na rozsahy koncentrací stanovované složky a látek matrice jiné, než jsou uvedené v dodatku B.

7.1. Opakovatelnost

Absolutní rozdíl mezi dvěma jednotlivými výsledky získanými se stejným vzorkem podrobené provozovatelem zkoušce pomocí stejného přístroje v nejkratším časovém intervalu nepřekročí hodnotu opakovatelnosti r ve více než 5 % případů.

$$r = 11 \text{ mg/l}$$

7.2. Reprodukovatelnost

Absolutní rozdíl mezi dvěma jednotlivými výsledky získanými se stejným vzorkem podrobené zkoušce ve dvou různých laboratořích nepřekročí hodnotu reprodukovatelnosti R ve více než 5 % případů.

$$R = 20 \text{ mg/l}$$

8. POZNÁMKY

S ohledem na stupeň přesnosti je třeba v případě potřeby potvrdit hodnoty kyseliny D-jablečné pod 50 mg/l jinou metodou rozboru, která používá jiný princip měření, jako např. metodu Przyborského a kol. (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215 – 218, 1993).

Vzorek vína v kyvetě by neměl překročit 0,1 ml, aby nedošlo k možné inhibici enzymatické aktivity polyfenoly.

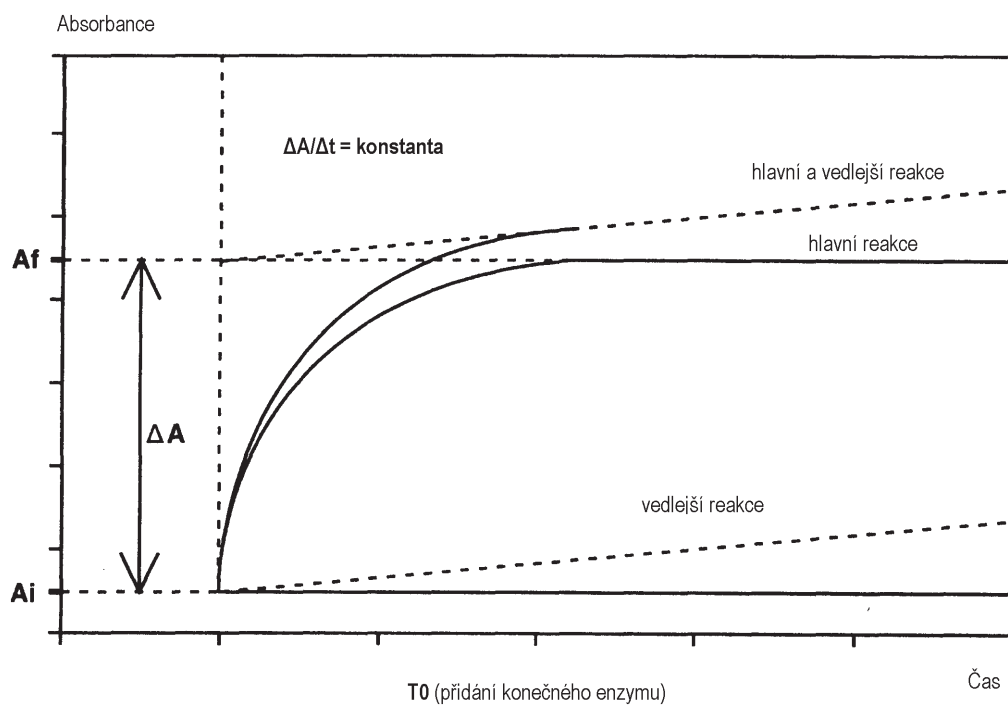
Dodatek A

Jak zacházet s vedlejšími reakcemi

Vedlejší reakce jsou obecně následkem sekundárních reakcí enzymu na přítomnost jiných enzymů v matrici nebo na vzájemnou reakci jednoho nebo více prvků matrice s kofaktorem v enzymatické reakci.

U běžné reakce dosahuje absorbance po určité době, obecně 10 až 20 minut, konstantní hodnoty v závislosti na rychlosti určité enzymatické reakce. Když však dojde k sekundárním reakcím, absorbance nedosáhne konstantní hodnoty, ale zvyšuje se pravidelně s postupem času. Tento typ procesu se běžně nazývá 'vedlejší reakce'.

Když nastane vedlejší reakce, je třeba měřit absorbanci roztoku v pravidelných intervalech (po každých dvou až pěti minutách) po uplynutí doby požadované k tomu, aby standardní roztok dosáhl své konečné absorbance. Pokud se absorbance zvyšuje pravidelně, je třeba provést pět až šest měření a extrapolovat zpět pomocí grafu nebo výpočtu za účelem určení absorbance, která by byla pozorována, kdyby byl přidán rozhodující enzym (T0). Koncentrace substrátu se počítá na základě rozdílu v absorbanci extrapolované v té době ($A_f - A_i$).



Obr. 1. Vedlejší reakce

Dodatek B

Statistické výsledky mezilaboratorní zkoušky

Rok mezilaboratorní zkoušky: 1995
 Počet laboratoří: 8
 Počet vzorků: 5 s přidavkem kyseliny D-jablečné

Vzorek	A	B	C	D	E
Počet laboratoří zachovaných po vyloučení laboratoří předkládajících odchylné výsledky	7	8	7	8	7
Počet laboratoří předkládajících odchylné výsledky	1	–	1	–	1
Počet přijatých výsledků	35	41	35	41	36
Průměrná hodnota (\bar{x})(mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Směrodatná odchylka opakovatelnosti (s_p) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSD_p) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Mez opakovatelnosti (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Relativní směrodatná odch. reprodukovatelnosti (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Mez reprodukovatelnosti (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Typy vzorků:

A: červené víno, B: červené víno, C: bílé víno, D: bílé víno, E: bílé víno.“

PŘÍLOHA II

„38. DERIVÁTY KYANIDŮ

(Pozor: při manipulaci s chemikáliemi chloraminem T, pyridinem, kyanidem draselným, kyselinou chlorovodíkovou a kyselinou fosforečnou dodržujte bezpečnostní opatření. Použité produkty řádně zlikvidujte v souladu s platnými environmentálními pravidly. Pozor na kyselinu kyanovodíkovou uvolněnou během destilace okyseleného vína.)

1. PRINCIP

Veškerá volná kyselina kyanovodíková ve víně se uvolňuje kyselou hydrolyzou a odděluje se destilací. Po reakci s chloraminem T a pyridinem se vytvořený glutakonový dialdehyd stanoví kolorimetricky na základě modrého zbarvení, které dává s kyselinou 1,3-dimethyl-barbiturovou.

2. VYBAVENÍ

2.1 Destilační aparatura

Používejte destilační aparaturu popsanou pro stanovení obsahu alkoholu ve víně.

2.2 Baňka o objemu 500 ml s kulatým dnem a s normalizovaným zábrusem.

2.3 Vodní lázeň řízená termostaticky na 20 °C.

2.4 Spektrofotometr umožňující měření absorbance při vlnové délce 590 nm.

2.5 Skleněné kyvety nebo kyvety na jedno použití s optickou dráhou 20 mm.

3. ČINIDLA

3.1 Kyselina fosforečná (H_3PO_4) při 25 % (hmotnost/objem)

3.2 Roztok chloraminu T ($C_7H_7ClNNa O_2S, 3H_2O$) 3 % (hmotnost/objem)

3.3 Roztok kyseliny 1,3-dimethyl-barbiturové: rozpustíte 3,658 g kyseliny 1,3-dimethyl-barbiturové ($C_6H_8N_2O_3$) v 15 ml pyridínu a 3 ml kyseliny chlorovodíkové ($p_{20} = 1,19$ g/ml) a přidejte 50 ml destilované vody.

3.4 Kyanid draselný (KCN)

3.5 Roztok jodidu draselného (KI) 10 % (hmotnost/objem)

3.6 Roztok dusičnanu stříbrného ($AgNO_3$), 0,1 M

4. POSTUP

4.1 Destilace

Do baňky o objemu 500 ml (2.2) dejte 25 ml vína, 50 ml destilované vody, 1 ml kyseliny fosforečné (3.1) a několik skleněných korálek. Baňku ihned položte do destilační aparatury. Pomocí zkosené trubice vedte destilát do odměrné baňky o objemu 50 ml, která obsahuje 10 ml vody. Odměrnou baňku ponořte do ledové vody. V odměrné baňce nashromážděte 30 až 35 ml destilátu (nebo celkem asi 45 ml kapaliny).

Zkosenou trubicí kondenzátoru propláchněte několika mililitry destilované vody, uveďte destilát na 20°C a doplňte destilovanou vodou až ke kalibrační značce.

4.2 Měření

Do kuželové baňky o objemu 50 ml se zabroušenou skleněnou zátkou dejte 25 ml destilátu, přidejte 1 ml roztoku chloraminu T a zazátkujte. Po přesně 60 vteřinách přidejte 3 ml roztoku kyseliny 1,3-dimethyl-barbiturové (3.3), zazátkujte a nechte stát 10 minut. Pak změřte absorbanci proti srovnávacímu vzorku (25 ml destilované vody místo 25 ml destilátu) při vlnové délce 590 nm v kyvetách s optickými dráhami 20 mm.

5. STANOVENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY

5.1 **Argentometrická titrace kyanidu draselného**

V odměrné baňce o objemu 300 ml rozpusťte asi 0,2 g KCN (3.4), pečlivě zvážených, ve 100 ml destilované vody. Přidejte 0,2 ml roztoku jodidu draselného (3.5) a titrujte roztokem dusičnanu stříbrného 0,1 M (3.6) až do doby, kdy získáte stabilní nažloutlé zbarvení.

1 ml roztoku dusičnanu stříbrného 0,1 M odpovídá 13,2 mg KCN; vypočtěte koncentraci vzorku KCN.

5.2 **Standardní křivka**5.2.1 *Příprava standardního roztoku*

Po stanovení koncentrace KCN podle postupu uvedeného v 5.1 připravte standardní roztok s obsahem 30 mg/l kyseliny kyanovodíkové (30 mg HCN = 72,3 mg KCN) Roztok zřeďte 1/10.

Zaveďte 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml a 5,0 ml zředěného roztoku do odměrných baněk o objemu 100 ml a doplňte až ke značce destilovanou vodou. Připravené roztoky obsahují 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg a 150 µg kyseliny kyanovodíkové na litr.

5.2.2 *Titrace*

Vezměte takto získané vzorky o objemu 25 ml a pokračujte, jak je uvedeno výše v bodech 4.1 a 4.2.

Hodnoty získané pro absorpenci s ohledem na standardní roztoky jako funkce odpovídajícího obsahu kyseliny kyanovodíkové mají tvořit přímku procházející počátkem.

6. VYJÁDRĚNÍ VÝSLEDKŮ

Kyselina kyanovodíková se uvádí v mikrogramech na litr (µg/l) bez desetinných míst.

6.1 **Metoda výpočtu**

Odečtěte obsah kyseliny kyanovodíkové na kalibrační křivce. Pokud byl vzorek zředěn, výsledek vynásobte faktorem zředění.

Opakovatelnost (r) a reprodukovatelnost (R)

Bílé víno = $r = 3,1 \mu\text{g/l}$ nebo přibližně 6 % x_i
R = 12 µg/l nebo přibližně 25 % x_i

Červené víno = $r = 6,4 \mu\text{g/l}$ nebo přibližně 8 % x_i
R = 23 µg/l nebo přibližně 29 % x_i

x_i = průměrná koncentrace HCN ve víně

x_i = 48,4 µg/l pro bílé víno

x_i = 80,5 µg/l pro červené víno.“

PŘÍLOHA III

44. STANOVENÍ ETHYL-KARBAMÁTU VE VÍNĚ: SELEKTIVNÍ DETEKČNÍ METODA S POUŽITÍM PLYNOVÉ CHROMATOGRÁFIE/HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

(Použitelné pro stanovení ethyl-karbamátu pro koncentrace 10 až 200 µg/l)

(Pozor: při manipulaci s chemikáliemi, ethanolem, acetonem a karcinogenními produkty (ethyl-karbamát a dichlormethan) dodržujte bezpečnostní opatření. Použitá rozpouštědla řádně zlikvidujte v souladu s platnými environmentálními pravidly.)

A. Princip

Ke vzorku se přidává propyl-karbamát jako vnitřní standard, roztok se ředí vodou a dává do extrakční kolony s 50 ml pevné fáze. Ethyl-karbamát a propyl-karbamát se eluují dichlormethanem.

Eluát se koncentruje ve vakuové rotační odparce. Koncentrát se analyzuje plynovou chromatografií (GC – Gas Chromatography). Detekce se provádí hmotnostní spektrometrií s použitím fragmentometrie v režimu SIM (selected ion monitoring – sledování vybraných iontů)

B. Aparatura a chromatografické podmínky (příklad)

- a) Plynový chromatograf/hmotnostní spektrometr (GC/MS) a v případě potřeby filtr vzorků a systém zpracování dat nebo rovnocenný.

Kapilární kolona z křemenného skla 30 m (*) × 0,25 mm vnitřní průměr, film 0,25 µm typu Carbowax 20M

Provoz: vstřikovač 180 °C, vektor heliového plynu při 1ml/minutu, vstřikování metodou bez dělení vstřikovaného množství.

Teplotní program: 40 °C po 0,75 minuty, pak zvyšovat o 10 °C/min. až na 60 °C, pak po 3 °C/min. až na 150 °C (**), pak zvýšit na 220 °C a udržovat tuto teplotu po 4,25 minuty. Specifický retenční čas pro ethyl-karbamát je 23 až 27 minut, pro propyl-karbamát 27 až 31 minut.

Rozhraní plynového chromatografu/spektrometru (GC/MS): převodní potrubí 220 °C. Parametry hmotnostního spektrometru ručně vyladěné perfluortributylaminem a optimalizované na nižší hmotnostní citlivost, režim snímání SIM, zpoždění rozpouštědla a čas zahájení snímání 22 minut, doba prodlevy/iont 100 ms.

- b) Vakuová rotační odparka nebo koncentrační systém obdobný systému Kuderna Danish.

(Poznámka: rychlost regenerace ethyl-karbamátu ze zkušebního vzorku, C(g) musí být během procesu mezi 90 a 110 %.)

- c) Baňka – hruškovitého tvaru, 300 ml, jediné zabroušené hrdlo.

- d) Koncentrační trubice – 4 ml, opatřená stupnicí, s teflonem potaženým spojem a zátkou.

C. Čidla

- a) Aceton – kvalita LC

(Poznámka: před použitím v GC/MS zkontrolujte každou dávku na nepřítomnost odezvy pro ionty s m/z 62, 74 a 89.)

- b) Dichlormethan

(Poznámka: před použitím v GC/MS analyzujte každou dávku po 200násobné koncentraci pro kontrolu nepřítomnosti odezvy pro ionty s m/z 62, 74 a 89.)

- c) Ethanol - bezvodý

(*) Pro určitá zvlášť plná vína může být žádoucí kapilární kolona 50 m.

(**) Pro určitá zvlášť plná vína může být žádoucí teplotní program 2 °C/min.

d) Standardní roztoky ethyl-karbamátu (EC)

1. Zásobní roztok – 1,00 mg/ml. Odvažte 100 mg EC (čistota 99 %) v odměrné baňce o objemu 100 ml a zřeďte acetonem.
2. Standardní pracovní roztok – 10,0 µg/ml. Přeneste 1 ml zásobního roztoku EC do odměrné baňky o objemu 100 ml a zřeďte acetonem až ke značce.

e) Propyl-karbamát (PC), standardní roztoky

1. Zásobní roztok – 1,00 mg/ml. Odvažte 100 mg PC (kvalita činidla) v odměrné baňce o objemu 100 ml a zřeďte acetonem.
2. Standardní pracovní roztok – 10,0 µg/ml. Přeneste 1 ml zásobního roztoku PC do odměrné baňky o objemu 100 ml a zřeďte acetonem až ke značce.
3. Vnitřní standard – 400 ng/ml. Přeneste 4 ml standardního pracovního roztoku PC do odměrné baňky o objemu 100 ml a zřeďte vodou až ke značce.

f) Standardní kalibrované roztoky EC-PC

Rozřeďte standardní pracovní roztok EC (d)(2) a standardní pracovní roztok PC (e)(2) dichlormethanem, abyste získali:

1. (100 ng EC a 400 ng PC)/ml;
2. (200 ng EC a 400 ng PC)/ml;
3. (400 ng EC a 400 ng PC)/ml;
4. (800 ng EC a 400 ng PC)/ml;
5. (1600 ng EC a 400 ng PC)/ml.

g) Zkušební vzorek – 100 ng EC/ml ve 40 % ethanolu

Přeneste 1 ml standardního pracovního roztoku EC (d)(2) do odměrné baňky o objemu 100 ml a zřeďte 40 % ethanolem až ke značce.

h) Extrakční kolona s pevnou fází – materiál na jedno použití naplněný křemelinou, kapacity 50 ml

Poznámka: Před rozbořením každou dávku extrakčních kolon zkontrolujte na regeneraci EC a PC a absenci odezvy pro ionty s m/z 62, 74 a 89. Připravte zkušební vzorek 100 ng EC/ml (g). Analyzujte 5,00 ml zkušební vzorku podle popisu v D(a), E a F. Regenerace 90 až 110 ng EC/ml je uspokojivá. Absorpční činidla, jejichž průměr částic je nepravidelný, mohou vést a pomalému toku, což ovlivňuje regeneraci EC a PC. Pokud po několika zkouškách není dosaženo 90 až 110 % hodnoty zkušební vzorku, vyměňte kolonu nebo k určení množství EC použijte upravenou kalibrační křivku regenerace. K získání upravené kalibrační křivky připravte standardní roztoky podle popisu v (f), ale místo dichlormethanu použijte 40 % ethanol.

Standardní kalibrační roztok analyzujte podle popisu v D, E a F.

Pomocí poměru EC/PC extrahovaných standardů stanovte novou kalibrační křivku.

D. Příprava zkušební vzorku

Do dvou oddělených kádinek o objemu 100 ml vložte následující objemy testovaných materiálů.

- a) vína o obsahu alkoholu více než 14 % objemových: 5,00 ± 0,01 ml;
- b) vína o obsahu alkoholu nejvýše 14 % objemových: 20,00 ± 0,01 ml.

Do každé kádinky přidejte 1 ml roztoku vnitřního standardu PC C(e)(3) a vodu tak, abyste získali celkový objem 40 ml (nebo 40 g).

E. Extrakce

Extrakci je třeba provádět pod digestoří s přiměřeným odtahem.

Vzorek připravený podle bodu D přeneste do extrakční kolony.

Kádinku vypláchněte 10 ml vody a vyplachovací vodu přeneste do kolony.

Ponechte kapalinu absorbovat po dobu čtyř minut. Vymyjte 2 x 80 ml dichlormethanu. Eluát zachycujte v kuželové baňce o objemu 300 ml.

Odpařte eluát na 2 až 3 ml v rotační odparce na vodní lázni o teplotě 30 °C (poznámka: nenechte odpařit do sucha).

Koncentrovaný zbytek přeneste Pasteurovou pipetou do trubice se stupnicí o objemu 4 ml.

Baňku vypláchněte 1 ml dichlormetanu a vyplachovací tekutinu přeneste do trubice. Vzorek koncentrujte na 1 ml pod slabým proudem dusíku.

V případě potřeby přeneste koncentrát do baňky automatického vzorkovače k rozboru GC/MS.

F. Rozbor GC/MS

a) Kalibrační křivka

Do GC/MS vstříkněte 1 µl každého standardního kalibračního roztoku C(f). Nakreslete graf poměru plochy EC-PC pro odezvu iontů s m/z 62 na svislé ose a množství EC v ng/mg na vodorovné ose (100, 200, 400, 800 a 1600 ng/ml).

b) Kvantifikace EC

Do systému GC/MS vstříkněte 1 µl koncentrovaného extraktu připraveného podle E a vypočítejte poměr plochy EC-PC pro iont s m/z 62. Pomocí kalibrační křivky vnitřního standardu stanovte koncentraci EC (ng/ml) v extraktu. Vypočítejte koncentraci EC v zkušební vzorku (ng/ml) tak, že vydělíte množství EC (ng) v extraktu objemem zkušební vzorku (ml).

c) Potvrzení totožnosti EC

Stanovte, zda se odezvy pro ionty s m/z 62, 74 a 89 objevují během retenčního času EC. Tyto odezvy jsou typické pro hlavní fragmenty $(M-C_2H_2)^+$ a $(M-CH_3)^+$ a molekulový iont $(M)^+$. Přítomnost EC se potvrzuje, pokud relativní poměry těchto iontů jsou mezi 20 % poměrů pro standard EC. Extrakt může být nutné dále koncentrovat za účelem dosažení dostatečné odezvy pro iont m/z 89.

G. Mezilaboratorní testy

Tabulka udává jednotlivé výsledky pro praktický připravený vzorek a pro oba typy vína.

Cochranův test vedl k vyloučení pouze jedné dvojice výsledků, pro víno o obsahu alkoholu více než 14 % objemových a pro víno o obsahu alkoholu nejvýše 14 % objemových ze dvou různých laboratoří.

Relativní reprodukovatelnost (RSD_R) má sklon k poklesu s tím, jak se zvyšuje koncentrace ethyl-karbamátu.

Provedení metody pro určení ethyl-karbamátu EC v alkoholických nápojích pomocí GC/MS.

Vzorek	Zjištěný průměr EC (ng/ml)	Regenerace přidaného EC (%)	S_f	S_R	RSD_f (%)	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