

31999R0761

L 99/4

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

14.4.1999

**ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 761/1999****z dnia 12 kwietnia 1999 r.****zmieniające rozporządzenie (EWG) nr 2676/90 określające wspólnotowe metody analizy wina**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając rozporządzenie Rady (EWG) nr 822/87 z dnia 16 marca 1987 r. w sprawie wspólnej organizacji rynku wina <sup>(1)</sup>, ostatnio zmienione rozporządzeniem (WE) nr 1627/98 <sup>(2)</sup>, w szczególności jego art. 74,

a także mając na uwadze, co następuje:

Załącznik do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 2676/90 <sup>(3)</sup>, ostatnio zmienionego rozporządzeniem (WE) nr 822/97 <sup>(4)</sup>, określa metody analizy; metoda analizy dla kwasu D-jabłkowego określona w rozdziale 20 okazała się być niezupełnie dokładna, dlatego rozwinięto nową, bardziej dokładną metodę; rozwinięto nową metodę dla analizy pochodnych cyjankowych, która jest bardziej czuła i łatwiejsza w stosowaniu; nowa metoda określania karbaminianu etylowego w winie została rozwinięta na poziomie międzynarodowym; te trzy metody zostały zalegalizowane zgodnie z międzynarodowo uznanymi kryteriami; stosowanie tych metod może zapewnić lepszą kontrolę autentyczności i jakości wina oraz zapobiec sporom powodowanym stosowaniem nieaktualnych i budzących wątpliwości odnośnie do ich wiarygodności metod analizy; opisy nowych metod zostały zatwierdzone przez Międzynarodowe Biuro ds. Winorośli i Wina; należy je włączyć do niniejszego rozporządzenia;

środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu Zarządzającego ds. Wina,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

*Artykuł 1*

W Załączniku do rozporządzenia (EWG) nr 2676/90 wprowadza się następujące zmiany:

- 1) rozdział 20 (Kwas D-jabłkowy) zastępuje się załącznikiem I do niniejszego rozporządzenia;
- 2) rozdział 38 (Pochodne cyjankowe) zastępuje się załącznikiem II do niniejszego rozporządzenia;
- 3) załącznik III do niniejszego rozporządzenia dodaje się jako rozdział 44.

*Artykuł 2*Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie siódmego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich Państwach Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 12 kwietnia 1999 r.

W imieniu Komisji

Franz FISCHLER

Członek Komisji

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 84 z 27.3.1987, str. 1.<sup>(2)</sup> Dz.U. L 210 z 28.7.1998, str. 10.<sup>(3)</sup> Dz.U. L 272 z 3.10.1990, str. 1.<sup>(4)</sup> Dz.U. L 117 z 7.5.1997, str. 10.

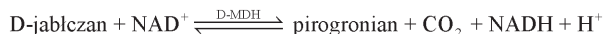
## ZAŁĄCZNIK I

## „20. KWAS D-JABŁKOWY

(metoda enzymatyczna)

## 1. ZASADA

W obecności dehydrogenazy D-jabłczanu (D-MDH) kwas D-jabłkowy (D-jabłczan) zostaje utleniony przez dinukleotyd nikotyno-amidoadeninowy do szczawiooctanu. Powstały szczawiooctan rozszczepia się na pirogronian i ditlenek węgla.



Ilość powstałego NADH jest proporcjonalna do stężenia kwasu D-jabłkowego i mierzy się ją z zastosowaniem długości fali 334, 340 lub 365 nm.

## 2. ODCZYNNIKI

Skład badania dla około 30 oznaczeń:

- a) Butla 1 zawierająca około 30 ml roztworu składającego się z buforu HEPES [N-(2-hydroksyetyl)piperazyna-N'-2-kwas 2 etanosulfonowy], pH = 9,0 oraz stabilizatory;
- b) Butla 2 zawierająca około 210 mg liofilizatu NAD;
- c) Trzy butle 3 zawierające liofilizat D-MDH, każda około 8 jednostek.

**Przygotowanie roztworu**

1. Użyć zawartości butli 1 nierozcieńczonej. Przed użyciem rozgrzać do 20-25 °C.
2. Rozpuścić zawartość butli 2 w 4 ml wody podwójnie destylowanej.
3. Rozpuścić zawartość jednej z butli 3 w 0,6 ml wody podwójnie destylowanej. Przed użyciem rozgrzać do 20-25 °C.

**Stabilność roztworów**

Zawartość butli 1 jest stabilna przez co najmniej jeden rok, jeśli jest przechowywana w temperaturze +4 °C; roztwór 2 jest stabilny przez trzy tygodnie, jeśli jest przechowywany w temperaturze +4 °C oraz przez dwa miesiące, jeśli jest przechowywany w temperaturze -20 °C; roztwór 3 jest stabilny przez pięć dni, jeśli jest przechowywany w temperaturze +4 °C.

## 3. APARATURA

- 3.1. Spektrometr pozwalający na pomiar przy długości fali 340 nm, to jest długości fali, przy której NADH ma maksimum absorpcji. W razie braku można użyć spektrometru ze źródłem nieciągłego widma pozwalającym na pomiary przy długości fali 334 lub 365 nm. Ponieważ uwzględnia się pomiary absolutnej absorpcji (tj. nie zestaw roztworów kalibracyjnych, lecz odniesienie do współczynnika ekstynkcji NADH), należy sprawdzić skalę długości fali oraz spektrum absorpcji.
- 3.2. Szklane kuwety z drogą światła 1 cm (w zależności od preferencji można użyć kuwet jednorazowych).
- 3.3. Mikropipety do pipetowania objętości w zakresie 0,01-2 ml.

## 4. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Analizę D-jabłczanu przeprowadza się normalnie bezpośrednio na winie, bez wstępnej dekoloryzacji.

Ilość D-jabłczanu w kuwecie powinna wynosić między 2 a 50 µg. Dlatego wino musi być rozcieńczone w celu otrzymania stężenia D-jabłczanu odpowiednio między 0,02 a 0,5 g/l lub 0,02 a 0,3 g/l (w zależności od używanego aparatu).

Tabela rozcieńczania:

Szacowana ilość D-jabłczanu/litr		Rozcieńczenie z wodą	Czynnik rozcieńczania F
Mierzone przy:			
340 lub 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. PROCEDURA

Za pomocą spektrometru ustawionego na szerokość fali 340 nm ustalać absorpcję, używając kuwet jednocentymetrowych, używając powietrza do ustawienia absorpcji zero (brak kuwety w ścieżce optycznej) lub używając wody.

Pipeta w kuwetach:

	Odniesienie	Badanie
Roztwór 1	1,00 ml	1,00 ml
Roztwór 2	0,10 ml	0,10 ml
Woda podwójnie destylowana	1,80 ml	1,70 ml
Próbka do pomiaru	-	0,10 ml

Zmieszać i po około sześciu minutach zmierzyć absorpcję roztworów odniesienia i roztworów do badań (A<sup>1</sup>).

Dodać:

	Odniesienie	Badanie
Roztwór 3	0,05 ml	0,05 ml

Zmieszać; poczekać na zakończenie reakcji (około 20 minut) i zmierzyć absorpcje roztworu odniesienia i roztworu do badań (A<sup>2</sup>).

Obliczyć różnice absorpcji (A<sup>2</sup> - A<sup>1</sup>) dla roztworu odniesienia (ΔA<sup>T</sup>) i roztworu do badań (ΔA<sup>E</sup>). Na zakończenie obliczyć różnicę między tymi różnicami: ΔA = ΔA<sup>E</sup> - ΔA<sup>T</sup>.

*Uwaga:* Czas wymagany dla zakończenia działania enzymu może być zróżnicowany w stosunku do różnych partii. Powyższy czas podany jest jedynie jako wskazówka i zaleca się, aby ustalać go dla poszczególnej partii.

Kwas D-jabłkowy reaguje szybko. Enzym przekształca kwas L-winowy, jednak o wiele wolniej. Tłumaczy to niewielką reakcję poboczną, którą można skorygować za pomocą ekstrapolacji (patrz dodatek A).

## 6. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

Ogólny wzór na obliczenie stężenia w mg/l jest następujący:

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

gdzie:

V = objętość roztworu do badań w ml (2,95 ml)

v = objętość próbki w ml (0,1 ml)

PM = masa molekularna substancji, która ma być ustalona (dla kwasu D-jabłkowego PM = 134,09)

d = ścieżka optyczna kuwety w cm (1 cm)

$\epsilon$  = współczynnik absorpcji NADH:

przy 340 nm = 6,3 (1 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

przy 365 nm = 3,4 (1 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

przy 334 nm = 6,18 (1 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Jeżeli próbka została rozcieńczona podczas jej przygotowywania, pomnożyć wynik przez współczynnik rozcieńczenia.

Stężenie kwasu D-jabłkowego podaje się w miligramach na litr (mg/l) bez miejsc liczb dziesiętnych.

## 7. DOKŁADNOŚĆ

Dane szczegółowe dotyczące próby międzylaboratoryjnej odnośnie do dokładności metody streszczone są w dodatku B. Wartości otrzymane z próby międzylaboratoryjnej mogą nie być stosowalne do zakresów zagęszczenia analitu oraz parametrów statystycznych innych niż podane w dodatku B.

### 7.1. Powtarzalność

Absolutna różnica między dwoma indywidualnymi wynikami otrzymanymi z identycznych materii poddanych próbie z zastosowaniem tej samej aparatury, w najkrótszych okresach czasu nie przekroczy wartości powtarzalności r w więcej niż 5 % przypadków.

r=11 mg/l.

### 7.2. Odtwarzalność

Absolutna różnica między dwoma niezależnymi wynikami otrzymanymi z badania przeprowadzonego na identycznej materii poddanej próbie w dwóch różnych laboratoriach nie przekroczy wartości odtwarzalności R w więcej niż 5 % przypadków.

R= 20 mg/l.

## 8. UWAGI

Z uwagi na stopień dokładności tej metody wartości kwasu D-jabłkowego poniżej 50 mg/l w razie konieczności powinny być potwierdzone inną metodą analizy z zastosowaniem innej zasady pomiaru, takiej jak zasada Przyborskiego *et al.* (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

Próbka wina w kuwecie nie powinna przekraczać 0,1 ml celem uniknięcia możliwego zahamowania aktywności enzymatycznej przez polifenole.

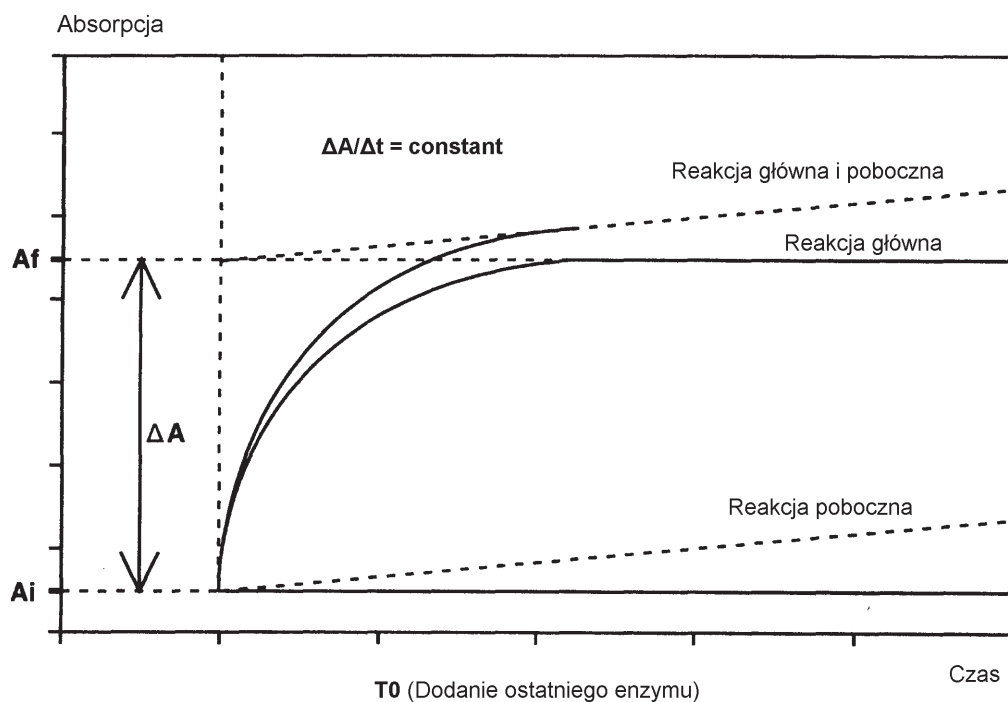
## Dodatek A

## Postępowanie z reakcjami pobocznymi

Reakcje poboczne wynikają zwykle z drugorzędnych reakcji enzymu, obecności innych enzymów w matrycy próbek lub interakcji jednego lub więcej elementów matrycy z kofaktorem reakcji enzymatycznej.

W przypadku normalnej reakcji absorpcja osiąga stałą wartość po pewnym czasie, zwykle po 10–20 minutach, w zależności od szybkości specyficznej reakcji enzymatycznej. Jednakże gdy występują reakcje drugorzędne, absorpcja nie osiąga wartości stałej, ale wzrasta regularnie w przedziale czasowym. Ten rodzaj procesu potocznie nazywa się „reakcją poboczną”.

Gdy występują reakcje poboczne, absorpcję roztworu powinno się mierzyć w regularnych odstępach czasu (co dwie do pięciu minut) po upływie czasu koniecznego, aby roztwór mianowany osiągnął absorpcję końcową. Jeśli absorpcja wzrasta regularnie, należy wykonać pięć lub sześć pomiarów i dokonać ich ekstrapolacji za pomocą wykresu lub obliczenia w celu ustalenia absorpcji, którą można było zaobserwować przy dodaniu ostatniego enzymu ( $T_0$ ). Stężenie substratu oblicza się na podstawie różnicy w ekstrapolacji absorpcji w tym czasie ( $A_f - A_i$ ).



Rysunek 1. Reakcja poboczna

## Dodatek B

**Rodzaje próbek:**

Rok próby międzylaboratoryjnej: 1995  
 Liczba laboratoriów: 8  
 Liczba próbek: 5 z dodatkiem kwasu D-jabłkowego

Próbka	A	B	C	D	E
Liczba laboratoriów pozostałych po odrzuceniu laboratoriów wykazujących aberracyjne wyniki	7	8	7	8	7
Liczba laboratoriów wykazujących aberracyjne wyniki	1	—	1	—	1
Liczba przyjętych wyników	35	41	35	41	36
Średnia wartość ( $\bar{x}$ )(mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Standardowe odchylenie powtarzalności (sr)(mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Granica powtarzalności (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Standardowe odchylenie odtwarzalności (sR) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Granica odtwarzalności (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Rodzaje próbek:

A: wino czerwone; B: wino czerwone; C: wino białe; D: wino białe; E: wino białe.”

## ZAŁĄCZNIK II

## „38. POCHODNE CYJANKOWE

(Uwaga: należy postępować zgodnie z zasadami bezpieczeństwa dotyczącymi używania chemikaliów, takich jak: chloramina T, pyrydyna, cyjanek potasu, kwas solny i kwas fosforowy. Pozbywać się zużytych produktów we właściwy sposób, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa w zakresie ochrony środowiska. Zachować ostrożność w związku z kwasem cyjanowodorowym wydzielającym się podczas destylacji wina zakwaszonego).

## 1. ZASADA

Całkowity wolny kwas cyjanowodorowy w winie wydziela się na drodze hydrolizy kwasowej i ulega oddzieleniu przez destylację. Po reakcji z chloraminą T i pyrydyną powstały dialdehyd glutaminowy ustala się za pomocą kolorymetrii na podstawie niebieskiego zabarwienia, które dialdehyd glutaminowy daje z kwasem 1,3-dimetylo-barbiturowym.

## 2. APARATURA

## 2.1. Aparat destylacyjny

Użyć aparatu destylacyjnego określonego dla oznaczania zawartości alkoholu w winie

- 2.2. Kolba okrągłodenna 500 ml o standardowych złączach szlifowych
- 2.3. Łaźnia wodna kontrolowana termostatycznie przy temperaturze 20 °C
- 2.4. Spektrometr pozwalający na pomiar absorpcji przy długości fali 590 nm
- 2.5. Szklane naczynia lub naczynia jednorazowego użytku ze ścieżkami optycznymi 20 mm

## 3. ODCZYNNIKI

- 3.1. Kwas fosforowy ( $H_3PO_4$ ) przy 25 % (m/v)
- 3.2. Roztwór chloraminy T ( $C_7H_7ClNNa O_2S, 3H_2O$ ) 3 % (m/v)
- 3.3. Roztwór kwasu 1,3-dimetylo-barbiturowego: rozpuścić 3,658 g kwasu 1,3-dimetylo-barbiturowego ( $C_6H_8N_2O_3$ ) w 15 ml pyrydyny i 3 ml kwasu solnego ( $\rho_{20} = 1,19$  g/ml) oraz dodać 50 ml wody destylowanej
- 3.4. Cyjanek potasu (KCN)
- 3.5. Jodek potasu (KI), roztwór 10 % (m/v)
- 3.6. Roztwór azotanu srebra ( $AgNO_3$ ), 0,1 M

## 4. PROCEDURA

## 4.1. Destylacja

Umieścić 25 ml wina, 50 ml wody destylowanej, 1 ml kwasu fosforowego (ppkt 3.1) oraz kilka koralików szklanych w kolbie 500-mililitrowej (ppkt 2.2). Kolbę niezwłocznie umieścić na aparacie destylacyjnym. Użyć chłodnicy w celu odprowadzenia destylatu do kolby kalibrowanej 50-mililitrowej, zawierającej 10 ml wody. Zanurzyć kolbę kalibrowaną w lodowatej wodzie. Zebrać 30–35 ml destylatu (lub całkowicie około 45 ml płynu) w kolbie kalibrowanej.

Przepłukać rurkę łączącą skraplacz kilkoma mililitrami wody destylowanej, podgrzać destylat do 20 °C i napęścić do linii kalibracyjnej wodą destylowaną.

## 4.2. Pomiar

Wlać 25 ml destylatu do kolby stożkowej 50-mililitrowej z korkiem szklanym docieranym, dodać 1 ml roztworu chloraminy T (ppkt 3.2) i zamknąć korkiem. Dokładnie po 60 sekundach dodać 3 ml roztworu kwasu 1,3-dimetylo-barbiturowego (ppkt 3.3), zamknąć korkiem i pozostawić na 10 minut. Następnie wykonać pomiar absorpcji w stosunku do roztworu kontrolnego (25 ml wody destylowanej zamiast 25 ml destylatu) przy długości fali 590 nm w kuwetach o ścieżce światła 20 mm.

## 5. OKREŚLENIE KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ

5.1. **Argentometryczne miareczkowanie cyjanku potasu**

Rozpuścić około 0,2 g KCN (ppkt 3.4), dokładnie odmierzonego, w 100 ml wody destylowanej w kolbie kalibrowanej na 300 ml. Dodać 0,2 ml roztworu jodku potasu (ppkt 3.5) i miareczkować z roztworem azotanu srebra (ppkt 3.6) do otrzymania ustalonej barwy żółtej.

Obliczyć stężenie próbki KCN, przyjmując, że 1 ml 0,1 M roztworu azotanu srebra odpowiada 13,2 mg KCN.

5.2. **Krzywa standardowa**5.2.1. *Przygotowanie roztworów standardowych*

Ustaliwszy stężenie KCN zgodnie z procedurą określoną w ppkt 5.1, przygotować roztwór mianowany zawierający 30 mg/l kwasu cyjanowodorowego (30 mg HCN 72,3 mg KCN). Rozcieńczyć roztwór w stosunku 1:10.

Wprowadzić próbki 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml rozpuszczonego roztworu do kolb kalibrowanych 100-mililitrowych i napełnić do linii kalibracyjnej wodą destylowaną. Przygotowane roztwory zawierają odpowiednio 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg oraz 150 µg kwasu cyjanowodorowego na litr.

5.2.2. *Miareczkowanie*

W sposób określony powyżej w ppkt 4.1 i 4.2 postępować z 25-mililitrowymi próbkami roztworu otrzymanego w ten sposób.

Wartości uzyskane dla absorpcji w stosunku do roztworów standardowych jako funkcja odpowiadająca zawartości kwasu cyjanowodorowego, która powinna utworzyć prostą linię, przechodzącą przez początek układu współrzędnych.

## 6. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

Zawartość kwasu cyjanowodorowego przedstawia się w mikrogramach na litr (µg/l) bez miejsc liczb dziesiętnych.

6.1. **Metoda obliczania**

Odczytać zawartość kwasu cyjanowodorowego na krzywej kalibracyjnej. Jeśli próbka była rozcieńczona, należy pomnożyć wyniki przez współczynnik rozcieńczenia.

*Powtarzalność (r) i odtwarzalność (R)*

$$\begin{aligned}\text{Wino białe} &= r = 3,1 \text{ } \mu\text{g/l} \text{ lub w przybliżeniu } 6 \% \cdot x_i \\ &R = 12 \text{ } \mu\text{g/l} \text{ lub w przybliżeniu } 25 \% \cdot x_i\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Wino czerwone} &= r = 6,4 \text{ } \mu\text{g/l} \text{ lub w przybliżeniu } 6 \% \cdot x_i \\ &r = 23 \text{ } \mu\text{g/l} \text{ lub w przybliżeniu } 6 \% \cdot x_i\end{aligned}$$

$x_i$  = średnie stężenie HCN w winie

$x_i$  = 48,4 µg/l dla wina białego

$x_i$  = 80,5 µg/l dla wina czerwonego.”

## ZAŁĄCZNIK III

44.

## OKREŚLENIE KARBAMINIANU ETYLU W WINIE: METODA SELEKTYWNEGO WYKRYWANIA PRZY ZASTOSOWANIU CHROMATOGRAFII GAZOWEJ/SPEKTROMETRII MASOWEJ

(Stosowana do określania karbaminianu etylu dla stężeń między 10 a 200 µg/l)

(Uwaga: postępować zgodnie z zasadami bezpieczeństwa dotyczącymi użycia takich chemikaliów, jak: alkohol etylowy, aceton oraz produkty rakotwórcze (karbaminian etylu oraz dichlorometan). Pozbywać się rozpuszczalników we właściwy sposób, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa w zakresie ochrony środowiska).

## A. Zasada

Karbaminian propylu dodaje się do próbki jako standard wewnętrzny, roztwór rozcieńcza się wodą i umieszcza w kolumnie ekstrakcyjnej fazy stałej 50 ml. Karbaminian etylowy i karbaminian propylowy są eluowane dichlorometanem.

Eluat ulega stężeniu w obrotowej wyparce próżniowej. Stężenie jest analizowane przy użyciu chromatografii gazowej (GC). Wykrywanie w zastosowaniu spektrometrii masowej z użyciem fragmentometrii w trybie SIM (monitorowanie wybranych jonów).

## B. Aparatura i warunki chromatograficzne (przykład)

- a) Chromatogram gazowy/spektrometr masowy (GC/MS) i, w razie konieczności, filtr próbki oraz system przetwarzania danych lub równoważnik

Kolumna kapilarna kwarcowa 30 m (\*) × 0,25 mm średnica wewnętrzna, 0,25 µg Carbowax 20 M

Operacja: wtryskiwacz 180 °C, przewodnik helowy 1 ml/minutę przy 25 °C, wtrysk bezrozlewczy

Temperatura programu: 40 °C przez 0,75 minuty, wzrastająca następnie o 10 °C/minutę, aż do 60 °C, potem o 3 °C/minutę aż do 150 °C (\*\*), wzrastająca do 220 °C i utrzymująca się przez 4,25 minuty. Charakterystyczny czas retencji karbaminianu etylu wynosi 23-27 minut, karbaminianu propylowego 27-31 minut.

Połączenie chromatogramu gazowego/spektrometru (GC/MS): linia przesyłowa 220 °C. Parametry spektrometru masowego ustawiane ręcznie z perfluorotributyloaminą i optymalizowany dla niższej czułości masowej, sposób akwizycji SIM, opóźnienie rozpuszczalnika i początek zbierania danych 22 minuty, magazynowanie danych/jon 100 ms.

- b) Obrotowa wyparka próżniowa lub system koncentracyjny podobny do duńskiego Kuderna.

(Uwaga: stopień odzysku karbaminianu etylowego z próbki do badań, pkt C lit. g), musi wynosić między 90 a 110 % w czasie trwania procesu.)

- c) Kolba – gruszkowa, 300 ml, pojedynczy korek szklany  
d) Próbówka zągęszczająca – 4 ml, z podziałką, z połączeniem pokrytym teflonem i korkiem

## C. Odczynniki

- a) Aceton – jakość LC

(Uwaga: odnośnie do każdej partii przed użyciem GC/MS sprawdzić, czy nie są wykrywalne jony m/z 62, 74 i 89.)

- b) Dichlorometan

(Uwaga: dokonać analizy każdej partii przed użyciem w GC/MS po stężeniu zwiększonym 200-krotnie, aby sprawdzić, czy nie są wykrywalne jony m/z 62, 74 i 89.)

- c) Alkohol etylowy – bezwodny

(\*) Dla określonych szczególnie bogatych win użycie kolumny kapilarnej 50 m.

(\*\*) Dla określonych szczególnie bogatych win może być konieczne zastosowanie programu temperatury 2 °C/minutę.

## d) Karbominian etylu (EC), roztwory standardowe

1. Roztwór podstawowy – 1,00 mg/ml. Odważyć 100 mg EC (czystość 99 %) w kolbie pomiarowej na 100 ml i rozcieńczyć acetonem.
2. Standardowy roztwór roboczy – 10,0 µg/ml. Przenieść 1 ml roztworu podstawowego do kolby pomiarowej na 100 ml i rozcieńczyć acetonem dodanym do poziomu cechy.

## e) Karbaminian propylu (PC), roztwory standardowe

1. Roztwór podstawowy – 1,00 mg/ml. Odważyć 100 mg PC (odczynnik czysty do analizy) w kolbie pomiarowej 100 ml i rozcieńczyć acetonem dodanym do poziomu cechy.
2. Standardowy roztwór roboczy – 10,0 µg/ml. Przenieść 1 ml roztworu podstawowego PC do kolby pomiarowej 100 ml i rozcieńczyć acetonem dodanym do poziomu cechy.
3. Roztwór wzorca wewnętrznego PC – 400 ng/ml. Przenieść 4 ml roztworu podstawowego PC do kolby pomiarowej na 100 ml i rozcieńczyć wodą do poziomu cechy.

## f) Roztwory kalibrowane standardowo EC-PC

Rozcieńczyć standardowy roztwór roboczy EC lit. d) pkt 2 oraz standardowy roztwór roboczy PC lit. e) pkt 2 z użyciem dichlorometanu w celu uzyskania:

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

## g) Próbką do badań – 100 ng EC/ml w 40 % alkoholu etylowego

Przenieść 1 ml standardowego roztworu roboczego EC, lit. d) pkt 2, do kolby pomiarowej na 100 ml i rozcieńczyć 40-procentowym alkoholem etylowym dodanym do poziomu cechy.

## h) Kolumna ekstrakcyjna fazy stałej – materiał jednorazowy, paczkowany z ziemią okrzemkową, objętość 50 ml

*Uwaga:* Przed analizą sprawdzić stopień odzyskania EC i PC dla każdej partii kolumn ekstrakcyjnych oraz czy nie są wykrywalne jony m/z 62,74 i 89. Przygotować 100 ng EC/ml próbki do badań lit. g). Dokonać analizy 5,00 ml próbki do badań według opisu w pkt D lit. a), pkt E i F. Odzysk 90-110 ng substancji EC/ml jest wynikiem zadowalającym. Absorbenty, których średnica cząstek jest nieregularna, mogą doprowadzić do zwolnienia przepływu, co wpływa na odzysk EC i PC. Jeśli po kilku próbach nie można uzyskać wartości próbki do badań 90-110 %, należy zmienić kolumnę lub użyć skorygowanej krzywej kalibracyjnej odzysku dla określenia ilościowego EC. W celu uzyskania skorygowanej krzywej kalibracyjnej należy przygotować roztwory standardowe zgodnie z opisem w lit. f), z użyciem 40-procentowego alkoholu etylowego zamiast dichlorometanu.

Dokonać analizy 1 ml standardowego roztworu kalibracyjnego zgodnie z opisem w pkt D, E i F.

Ustalić nową krzywą kalibracyjną z użyciem stosunku EC/PC wyekstrahowanych standardów.

**D. Przygotowanie próbki do badań**

Umieścić następujące objętości materiałów do badania w dwóch oddzielnych zlewkach na 100 ml:

- a) wina o zawartości alkoholu ponad 14 %: 5,00 ± 0,01 ml;
- b) wina o maksymalnej zawartości alkoholu 14 %: 20,00 ± 0,01 ml.

Do każdej zlewki dodać 1 ml roztworu wzorca wewnętrznego PC pkt C lit. e) pkt 3 i wodę w celu otrzymania całkowitej objętości 40 ml (lub 40 g).

**E. Ekstrakcja**

Ekstrakcję należy przeprowadzać pod kapturem ekstraktora, przy odpowiedniej wentylacji.

Przenieść próbkę przygotowaną w pkt D do kolumny ekstrakcyjnej.

Przepłukać zlewkę 10 ml wody i przenieść wodę płuczącą do kolumny.

Pozostawić ciecz do absorpcji na kilka minut. Eluować z użyciem  $2 \times 80$  ml dichlorometanu. Zebrać eluat w kolbie stożkowej na 300 ml.

Eluować 2-3 ml w obrotowej wyparce łaźni wodnej przy 30 °C. (Uwaga: nie dopuścić do zagotowania na sucho.)

Przenieść stężoną pozostałość do rurki z podziałką 4 ml z użyciem pipety Pasteura.

Przepłukać kolbę 1 ml dichlorometanu i przenieść ciecz płuczącą do rurki. Stężyć próbkę do 1 ml pod słabym strumieniem nitroenu.

W razie konieczności przenieść koncentrat do kolby do automatycznego pobierania próbek dla analizy GC/MS.

#### F. Analiza GC/MC

##### a) Krzywa odwzorowania

Wstrzyknąć 1  $\mu$ l każdego standardowego roztworu kalibracji pkt C lit. f) do GC/MS. Narysować wykres pola stosunku EC-PC dla obecności jonu m/z 62 na pionowej osi oraz ilość EC w ng/ml na osi poziomej (100, 200, 400, 800, 1600 ng/ml).

##### b) Kwantyfikacja EC

Wstrzyknąć 1  $\mu$ l stężonego ekstraktu przygotowanego w pkt E do systemu GC/MS i obliczyć pole stosunku EC/PC dla obecności jonu m/z 62. Ustalić stężenie EC (ng/ml) w ekstrakcie z użyciem krzywej odwzorowania standardów wewnętrznych. Obliczyć stężenie EC w próbce do badań (ng/ml), dzieląc ilość EC (ng) w ekstrakcie przez objętość próbki do badań (ml).

##### c) Potwierdzenie tożsamości EC

Ustalić, czy obecność jonów m/z 62, 74 i 89 odnotowuje się w okresie retencji EC. Obecności te są cechami głównych fragmentów odpowiednio  $(M-C_2H_2)^+$  i  $(M-CH_3)^+$  i jonu cząsteczkowego  $(M)^+$ . Obecność EC jest potwierdzona, jeśli względne stosunki tych jonów mieszczą się w obrębie 20 % stosunków dla standardu EC. Może zaistnieć potrzeba dalszego stężenia ekstraktu w celu uzyskania wystarczającej obecności jonu m/z 89.

#### G. Zbiorcza analiza

Tabela pokazuje indywidualne wyniki do przygotowania próbki rozproszonej dla obydwu rodzajów wina.

Badanie Cochran'a doprowadziło do eliminacji jedynie jednej pary wyników, dla wina o zawartości alkoholu powyżej 14 % i dla wina o zawartości alkoholu wynoszącej 14 % lub mniej, z dwóch różnych laboratoriów.

Względna odtwarzalność (RSDR) wykazuje tendencje do obniżania się przy wzroście stężenia karbaminianu etylu.

#### Przedstawienie metody dla określenia karbaminianu etylu EC w napojach alkoholowych metodą GC/MS

Próbka	Średnia ilość wykrytego EC (ng/ml)	Regeneracja dodanego EC (%)	Sr	SR	RSDr (%)	RSDR (%)
Wina > 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
Wina 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