RÈGLEMENT (CE) N° 761/1999 DE LA COMMISSION

du 12 avril 1999

modifiant le règlement (CEE) n° 2676/90 déterminant des méthodes d'analyse communautaires applicables dans le secteur du vin

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CEE) n° 822/87 du Conseil du 16 mars 1987 portant organisation commune du marché viti-vinicole ([1]), modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 1627/98 ([2]), et notamment son article 74,

considérant que le règlement (CEE) n° 2676/90 de la Commission ([3]), modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 822/97 ([4]), décrit ces méthodes d'analyse dans son annexe, que la méthode d'analyse pour l'acide D-malique décrite au chapitre 20 s'est révélée peu précise, et qu'une nouvelle méthode plus exacte a été développée; qu'une nouvelle méthode d'analyse pour les dérivés cyanés plus sensible et plus facile à mettre en œuvre a été développée; qu'une nouvelle méthode pour le dosage du carbamate d'éthyle dans les vins a été développée au niveau international; que ces trois nouvelles méthodes ont été validées selon des critères internationalement reconnus; que l'utilisation de ces méthodes peut assurer un meilleur contrôle de la qualité et de l'authenticité des vins et éviter les litiges dus à l'application de méthodes d'analyse anciennes et peu fiables; que la description de ces nouvelles méthodes a été adoptée par l'office international de la vigne et du vin; qu'il convient, de les incorporer dans le règlement en question;

considérant que les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion des vins,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

L'annexe du règlement (CEE) n° 2676/90 est modifiée comme suit:

1) Le chapitre 20 «Acide D-malique» est remplacé par l'annexe I du présent règlement.
2) Le chapitre 38 «Dérivés cyanés» est remplacé par l'annexe II du présent règlement.
3) Le chapitre 44 figurant à l'annexe III du présent règlement est ajouté.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le septième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes.*

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 12 avril 1999.

Par la Commission

Franz FISCHLER

Membre de la Commission

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

ANNEXE I

«20. ACIDE D-MALIQUE

Dosage par méthode enzymatique

1. PRINCIPE

En présence de D-malate-deshydrogénase (D-MDH), l'acide D-malique (D-malate) est oxydé en oxalo-acétate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD). L'oxalo-acétate formé est transformé en pyruvate et dioxyde de carbone.

$$\text{D-malate} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{D-MDH}} \text{pyruvate} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$

La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 334, 340 ou 365 nm, est proportionnelle à la quantité de D-malate présente.

2. RÉACTIFS

Les réactifs permettant environ 30 déterminations sont présentés dans le commerce en coffret comprenant:

a) Flacon 1 contenant environ 30 ml de solution de tampon Hepes [acide N-(2-hydroxy-éthyl)pipérazine-N'-2-éthane sulfonique] pH = 9,0 et stabilisateurs;

b) Flacon 2 contenant environ 210 mg de lyophilisat de NAD;

c) Flacon 3 (au nombre de trois), contenant le lyophilisat de D-MDH, titrant environ 8 unités.

Préparation des solutions

1. Utiliser le contenu du flacon 1 sans dilution. Amener la solution à 20-25 °C avant l'emploi.

2. Dissoudre le contenu du flacon 2 dans 4 ml d'eau bidistillée.

3. Dissoudre le contenu d'un des flacons 3 dans 0,6 ml d'eau bidistillée. Amener la solution à 20-25 °C avant l'emploi.

Stabilité des solutions

Le contenu du flacon 1 se conserve au moins un an à + 4 °C; la solution 2 se conserve environ 3 semaines à + 4 °C et 2 mois à − 20 °C; la solution 3 se conserve 5 jours à + 4 °C.

3. APPAREILLAGE

3.1. Spectrophotomètre permettant d'effectuer les mesures à 340 nm, maximum d'absorption du NADH. À défaut, photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm et 365 nm. S'agissant de mesures absolues d'absorbance (pas de gamme d'étalonnage, mais référence au coefficient d'extinction du NADH), les échelles des longueurs d'onde et des absorbantes de l'appareil doivent être contrôlées.

3.2. Cuves de 1 cm de trajet optique en verre ou cuves à usage unique.

3.3. Micropipettes permettant de prélever des volumes compris entre 0,01 et 2 ml.

4. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Le dosage du D-malate s'effectue généralement directement sur le vin sans décoloration préalable.

La quantité de D-malate dans la cuve devant être comprise entre 2 µg et 50 µg, il convient de diluer le vin de telle manière que la concentration en malate soit comprise entre 0,02 et 0,5 g/l ou 0,02 et 0,3 g/l (selon l'appareillage utilisé).

Tableau de dilution:

Quantité estimée de D-malate/litre		Dilution avec de l'eau	Facteur de dilution F
Mesure à:			
340 ou 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. MODE OPÉRATOIRE

Le spectrophotomètre étant réglé sur la longueur d'onde 340 nm, les mesures d'absorbance se font dans les cuves de 1 cm de trajet optique, l'absorbance zéro étant réglée par rapport à l'air (pas de cuve sur le trajet optique) ou par rapport à l'eau.

Dans les cuves de 1 cm de trajet optique, introduire:

	Témoin	Essai
Solution 1	1,00 ml	1,00 ml
Solution 2	0,10 ml	0,10 ml
Eau bidistillée	1,80 ml	1,70 ml
Échantillon	—	0,10 ml

Mélanger. Après environ six minutes, mesurer les absorbances des solutions témoin et essai (A_1).

Ajouter:

	Témoin	Essai
Solution 3	0,05 ml	0,05 ml

Mélanger; attendre la fin de la réaction (environ 20 minutes) et mesurer les absorbances des solutions témoin et d'essai (A_2).

Déterminer les différences d'absorbances ($A_2 - A_1$) du témoin (ΔA_T) et de l'essai (ΔA_E). Déduire la différence d'absorbance du témoin de la différence d'absorbance de l'essai: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Remarque: Le temps nécessaire à l'action des enzymes peut varier d'un lot à l'autre. Il n'est donné ci-dessus qu'à titre indicatif. Il est recommandé de le déterminer pour chaque lot.

L'acide D-malique réagit vite. Une activité supplémentaire de l'enzyme transforme aussi l'acide L-tartrique même si la vitesse est beaucoup moins rapide. C'est la raison pour laquelle il y a une faible réaction parasite qu'il est possible de corriger par extrapolation (voir appendice A).

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

La concentration en milligrammes par litre est calculée par la formule générale:

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

V = volume du test en ml (ici 2,95 ml)
v = volume de l'échantillon en ml (ici 0,1 ml)
PM = masse moléculaire de la substance à doser (ici acide D-malique = 134,09)
d = trajet optique de la cuve en cm (ici 1 cm)
ε = coefficient d'absorption du NADH:
à 340 nm = 6,3 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
à 365 nm = 3,4 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
à 334 nm = 6,18 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

La concentration en acide D-malique est donnée en milligrammes par litre (mg/l) sans décimale.

7. FIDÉLITÉ

Les détails de l'essai interlaboratoire portant sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'appendice B. Les valeurs dérivées de l'essai interlaboratoire peuvent ne pas être applicables aux gammes de concentration en analyte et aux matrices autres que celles données en appendice B.

7.1. **Répétabilité**

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur une matière identique soumise à essai, par un opérateur utilisant le même appareillage, dans l'intervalle de temps le plus court, ne dépassera pas la valeur de répétabilité r dans plus de 5 % des cas.

La valeur est: r = 11 mg/l.

7.2. **Reproductibilité**

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur une matière identique soumise à essai dans deux laboratoires ne dépassera pas la valeur de reproductibilité R dans plus de 5 % des cas.

La valeur est : R = 20 mg/l.

8. REMARQUES

Compte tenu de la précision de la méthode, les valeurs d'acide D-malique inférieures à 50 mg/l doivent, au besoin, être confirmées par une autre méthode d'analyse utilisant un autre principe de mesure par exemple celle de Przyborski et al, (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

La prise d'essai de vin dans la cuvette ne doit pas être supérieure à 0,1 ml pour éviter d'éventuelles inhibitions de l'activité enzymatique par les polyphénols.

APPENDICE A

Comment traiter les réactions parasites

Les réactions parasites sont généralement dues à des réactions secondaires de l'enzyme, à la présence d'autres enzymes dans la matrice de l'échantillon, ou à l'interaction d'un ou plusieurs éléments de la matrice avec un cofacteur de la réaction enzymatique.

Dans la réaction normale, l'absorbance atteint une valeur constante au bout d'un certain temps, généralement entre 10 et 20 minutes, selon la vitesse de la réaction enzymatique spécifique. Cependant, lorsqu'il se produit des réactions secondaires, l'absorbance n'atteint pas une valeur constante, mais augmente régulièrement dans le temps; ce type de processus est couramment appelé «réaction parasite».

Lorsque ce problème se pose, il convient de mesurer l'absorbance de la solution à intervalles réguliers (2 à 5 minutes), après le temps requis pour que la solution étalon atteigne son absorbance finale. Lorsque l'absorbance augmente régulièrement, procéder à 5 ou 6 mesures, puis faire une extrapolation graphique ou par calcul, pour obtenir l'absorbance qui aurait été celle de la solution au moment où l'enzyme final a été ajouté (T0). La différence d'absorbance extrapolée à ce moment (Af — Ai) est utilisée dans le calcul de la concentration du substrat.

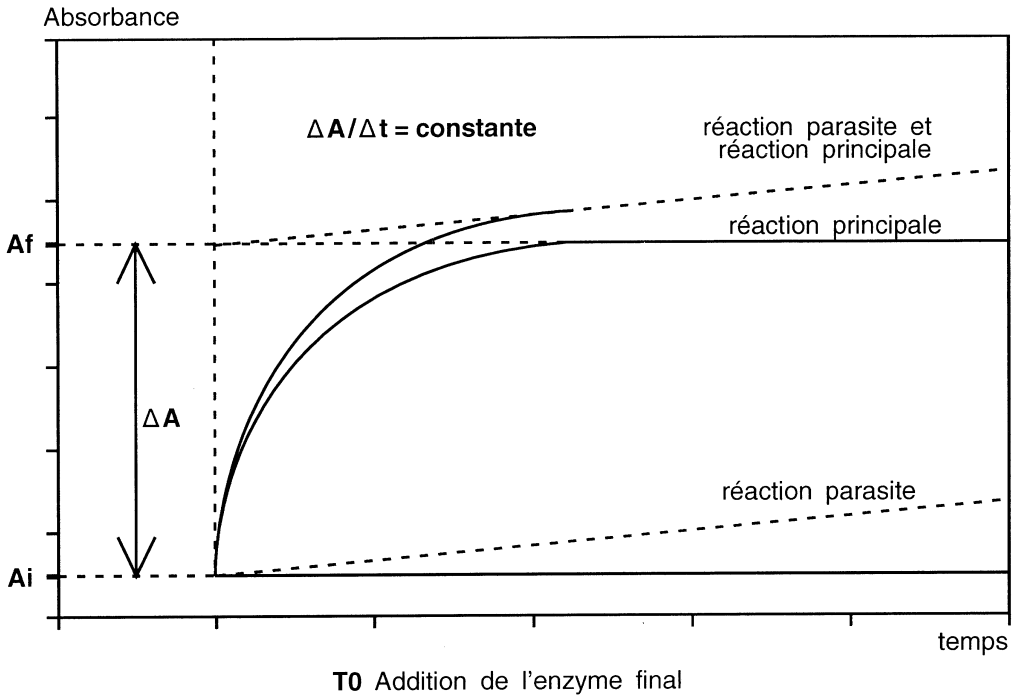


Figure 1: réaction parasite

APPENDICE B

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoire:

Année de l'essai interlaboratoire: 1995
Nombre de laboratoires: 8
Nombre d'échantillons: 5 avec addition d'acide D-malique

Échantillon	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des laboratoires présentant des résultats aberrants	7	8	7	8	7
Nombre de laboratoires ayant des résultats aberrants	1	—	1	—	1
Nombre de résultats acceptés	35	41	35	41	36
Valeur moyenne ($\overline{\chi}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Écart-type de répétabilité (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Écart-type relatif à la répétabilité (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Limite de répétabilité (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Écart-type de reproductibilité (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Écart-type relatif à la reproductibilité (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Limite de reproductibilité (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Types d'échantillons:
A: vin rouge; B: vin rouge; C: vin blanc; D: vin blanc; E: vin blanc.»

ANNEXE II

«38. **DÉRIVÉS CYANÉS**

(*Attention*: Respecter les consignes de sécurité pour les manipulations des produits chimiques, pour la chloramine T, la pyridine, le cyanure de potassium, l'acide chlorhydrique et l'acide phosphorique. Se débarrasser des produits utilisés de manière appropriée compatible avec les règles et les règlements écologiques applicables. Précaution avec l'acide cyanhydrique libéré lors de la distillation du vin acidifié).

1. PRINCIPE

L'acide cyanhydrique libre et total du vin est libéré par hydrolyse acide et séparé par distillation. Après réaction avec la chloramine T et la pyridine, le dialdéhyde glutaconique formé est dosé par colorimétrie grâce à la coloration bleue qu'il donne avec l'acide diméthyl-1,3 barbiturique.

2. APPAREILLAGE

2.1. **Appareil de distillation**

Utiliser l'appareil de distillation décrit pour la détermination du titre alcoométrique volumique du vin.

2.2. Ballon de 500 ml à rodage normalisé.

2.3. Bain d'eau; thermostaté à 20 °C.

2.4. Spectrophotomètre permettant les mesures d'absorbance à la longueur d'onde de 590 nm.

2.5. Cuves de verre ou cuves à usage unique de 20 mm de trajet optique.

3. RÉACTIFS

3.1. Acide phosphorique (H_3PO_4) à 25 % (m/v)

3.2. Solution de chloramine T(C_7H_7 ClNNa O_2S, $3H_2O$) 3 % (m/v)

3.3. Solution d'acide 1,3-diméthylbarbiturique: dissoudre 3,658 g de l'acide 1,3-diméthylbarbiturique ($C_6H_8N_2O_3$) dans 15 ml de pyridine et 3 ml d'acide chlorhydrique (ρ_{20} = 1,19 g/ml) et compléter à 50 ml avec de l'eau distillée.

3.4. Cyanure de potassium (KCN)

3.5. Solution d'iodure de potassium (KI) 10 % (m/v)

3.6. Solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$), 0,1 M

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. **Distillation**

Dans le ballon de 500 ml (2.2) placer 25 ml de vin, 50 ml d'eau distillée, 1 ml d'acide phosphorique (3.1) et quelques perles de verre. Mettre immédiatement en place le ballon sur l'appareil à distiller. Amener le distillat au moyen d'un tube effilé dans une fiole jaugée de 50 ml contenant 10 ml d'eau. La fiole jaugée est immergée dans de l'eau glacée. Recueillir 30-35 ml de distillat (soit environ 45 ml de liquide total dans la fiole jaugée).

Laver le tube effilé du réfrigérant avec quelques millilitres d'eau distillée, porter à 20 °C le distillat et amener au trait de jauge avec de l'eau distillée.

4.2. **Mesure**

Placer 25 ml de distillat dans une fiole conique de 50 ml munie d'un bouchon rodé, ajouter 1 ml de solution de chloramine T (3.2) et boucher hermétiquement. Après 60 secondes exactement ajouter 3 ml de solution d'acide diméthyl-1,3 barbiturique (3.3), boucher hermétiquement et laisser au repos pendant 10 minutes. Ensuite mesurer l'absorbance par rapport au témoin (25 ml d'eau distillée au lieu de 25 ml de distillat) à la longueur d'onde 590 nm dans les cuves de 20 mm de trajet optique.

5. ÉTABLISSEMENT DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

5.1. **Titrage argentimétrique du cyanure de potassium**

Dans une fiole jaugée de 300 ml dissoudre environ 0,2 g de KCN (3.4) exactement pesé dans 100 ml d'eau distillée. Ajouter 0,2 ml de solution d'iodure de potassium (3.5) et titrer avec la solution de nitrate d'argent 0,1 M (3.6) jusqu'à obtention d'une coloration jaunâtre stable.

1 ml de solution 0,1 M de nitrate d'argent correspondant à 13,2 mg de KCN, calculer le titre de l'échantillon de KCN.

5.2. **Courbe d'étalon**

5.2.1. *Préparation des solutions étalons*

Connaissant le titre déterminé selon 5.1 du KCN, préparer une solution étalon contenant 30 mg/l d'acide cyanhydrique (30 mg HCN ≙ 72,3 mg KCN). Diluer cette solution au 1/10.

Introduire 1,0- 2,0- 3,0- 4,0- et 5,0 ml de la solution étalon diluée dans des fioles jaugées de 100 ml et amener au trait de jauge avec de l'eau distillée. Les solutions préparées titrent respectivement 30-60-90-120 et 150 µg/l d'acide cyanhydrique.

5.2.2. *Dosage*

Prélever 25 ml des solutions ainsi obtenues et continuer comme il est indiqué ci-dessus en 4.1 et 4.2.

Les valeurs obtenues pour les absorbances avec ces solutions étalons reportées en fonction des teneurs en acide cyanhydrique correspondantes, s'alignent sur une droite passant par l'origine.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

L'acide cyanhydrique est exprimé en microgrammes par litre (µg/l) sans décimale.

6.1. **Calcul**

Lire la teneur en acide cyanhydrique sur la courbe d'étalonnage. Si une dilution a été effectuée, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

Répétabilité (r) et reproductibilité (R)

Vin blanc = r = 3,1 µg/l soit environ 6 % · x_i

R = 12 µg/l soit environ 25 % · x_i

Vin rouge = r = 6,4 µg/l soit environ 8 % · x_i

R = 23 µg/l soit environ 29 % · x_i

x_i = concentration moyenne de HCN dans le vin

x_i = 48,4 µg/l pour le vin blanc

x_i = 80,5 µg/l pour le vin rouge.»

ANNEXE III

44. DOSAGE DU CARBAMATE D'ÉTHYLE DANS LES VINS: MÉTHODE DE DÉTECTION SÉLECTIVE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE/SPECTROMÉTRIE DE MASSE

(Applicable à la détermination du carbamate d'éthyle pour des concentrations comprises entre 10 et 200 µg/l)

(*Attention:* Respecter les consignes de sécurité pour les manipulations des produits chimiques, pour l'éthanol, l'acétone et les produits carcinogènes: carbamate d'éthyle et dichlorométhane. Se débarrasser des solvants usés de manière appropriée compatible avec les règles et les règlements écologiques applicables).

A. **Principe de la méthode**

Le carbamate de propyle est ajouté à un échantillon comme étalon interne, la solution est diluée avec de l'eau et est placée dans une colonne d'extraction en phase solide de 50 ml. Le carbamate d'éthyle et le carbamate de propyle sont élués avec du dichlorométhane.

L'éluat est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. Le concentré est analysé par chromatographie en phase gazeuse (CG), la détection est effectuée par spectrométrie de masse par fragmentométrie en mode SIM (Selected ion monitoring).

B. **Appareillage et conditions chromatographiques (donnés à titre d'exemple)**

a) Chromatogramme en phase gazeuse/spectromètre de masse (CG/SM) et éventuellement un passeur d'échantillons et système de traitement de données ou équivalent.

Colonne capillaire en silice greffée 30 m (*) x 0,25 mm de diamètre interne, 0,25 µm de film de type Carbowax 20M.

Mode opératoire: injecteur 180 °C, gaz vecteur hélium à 1 ml/min. et à 25 °C, injection selon la méthode «Splitless/split».

Programme de température: 40 °C pendant 0,75 minute, puis programmation à 10 °C/minute jusqu'à 60 °C, puis 3 °C/minute jusqu'à 150 °C (**), aller jusqu'à 220 °C puis maintenir pendant 4,25 minutes à 220 °C. Le temps de rétention spécifique du carbamate d'éthyle est de 23 à 27 minutes, celui du carbamate de propyle est de 27 à 31 minutes.

Chromatographe en phase gazeuse/spectromètre (CG/SM) interface: ligne de transfert 220 °C. Paramètres du spectromètre de masse mis au point manuellement avec de la perfluorotributylamine et optimisé pour une sensibilité de masse plus basse, mode acquisition SIM, délai solvant et temps de commencement de l'acquisition 22 minutes, temps de maintien/ion 100 ms.

b) Évaporateur rotatif sous vide ou système de concentration de type Kuderna Danish.

(*NB:* le taux de récupération du carbamate d'éthyle de l'échantillon test, C(g) doit être compris entre 90 et 110 % pendant le processus).

c) Fiole — en forme de poire, 300 ml, col unique à rodage.

d) Tube de concentration — 4 ml, gradué, avec un joint à pellicule de téflon et bouchon.

C. **Réactifs**

a) Acétone — qualité LC

NB: Vérifier chaque lot avant usage par CG/SM concernant l'absence de réponse pour les ions de m/z 62, 74 et 89.

b) Dichlorométhane

NB: Analyser chaque lot avant usage par CG/SM après concentration 200 fois, concentration pour vérifier l'absence de réponse pour les ions de m/z 62, 74 et 89.

c) Éthanol — anhydre

(*) Pour certains vins particulièrement riches, il peut s'avérer souhaitable d'utiliser une colonne capillaire de 50 m de long.
(**) Pour certains vins particulièrement riches, il peut s'avérer souhaitable d'effectuer une programmation de température de 2 °C par minute.

d) Carbamate d'éthyle (CE); solutions standard

1) Solution «mère» — 1,00 mg/ml. Peser 100 mg CE (≥ 99 % pureté) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone.

2) Solution standard de travail — 10,0 µg/ml. Transférer 1 ml de la solution «mère» CE dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.

e) Carbamate de propyle (CP), solutions standard

1) Solution «mère» — 1,00 mg/ml. Peser 100 mg CP (qualité réactif) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.

2) Solution standard de travail 10,0 µg/ml. Transférer 1 ml de la solution «mère» CP dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.

3) Solution standard interne CP — 400 ng/ml. Transférer 4 ml de solution standard de travail CP dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'eau jusqu'au trait de jauge.

f) Solutions standard calibrées CE-CP

Diluer les solutions standard de travail de CE, d) 2), et CP e) 2), avec du dichlorométhane pour obtenir:

1) (100 ng CE et 400 ng CP)/ml;

2) (200 ng CE et 400 ng CP)/ml;

3) (400 ng CE et 400 ng CP)/ml;

4) (800 ng CE et 400 ng CP)/ml;

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

g) Échantillon test — 100 ng CE/ml dans 40 % d'éthanol

Transférer 1 ml des solutions standard de travail CE, d) 2) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec 40 % d'éthanol jusqu'au trait de jauge.

h) Colonne d'extraction en phase solide — Matériel jetable, pré-emballé avec de la terre de diatomées, capacité 50 ml

NB: Avant analyse, vérifier chaque lot de colonnes d'extraction pour la récupération du CE et CP et l'absence de réponse pour les ions de m/z 62, 74 et 89. Préparer 100 ng CE/ml d'échantillon test (g). Analyser 5,00 ml de l'échantillon test comme décrit dans D a), E et F. La récupération de 90-110 ng de CE/ml est satisfaisante. Des absorbants dont le diamètre des particules est irrégulier peuvent entraîner des débits très lents qui affectent la récupération du CE et du CP. Si, après plusieurs essais, 90-110 % de la valeur de l'échantillon test n'est pas obtenue, changer la colonne ou utiliser une courbe de calibration de récupération corrigée pour quantifier le CE. Pour obtenir la courbe de calibration corrigée, préparer des solutions standards comme décrites dans f) en utilisant 40 % d'éthanol au lieu du dichlorométhane.

Analyser 1 ml de la solution standard de calibration comme décrit en D, E et F.

Construire une nouvelle courbe d'étalonnage en utilisant le rapport CE/CP des standards extraits.

D. **Préparation de l'échantillon test**

Placer le matériel test dans 2 béchers séparés de 100 ml en utilisant les quantités suivantes:

a) Vins titrant plus de 14 % vol. d'alcool: 5,00 ml ± 0,01 ml.

b) Vins titrant au plus 14 % vol. d'alcool: 20,00 ml ± 0,01 ml.

Dans chaque bécher, ajouter 1 ml de solution CP d'étalon interne, C e) 3) et de l'eau, afin d'obtenir un volume total de 40 ml (ou 40 g).

E. **Extraction**

Exécuter l'extraction sous la hotte aspirante avec une ventilation adéquate.

Transférer la préparation réalisée en D dans la colonne d'extraction.

Rincer le bécher avec 10 ml d'eau et transférer l'eau de rinçage dans la colonne.

Laisser le liquide s'absorber dans la colonne pendant 4 minutes — Éluer par 2 x 80 ml de dichlorométhane. Recueillir l'éluat dans une fiole conique de 300 ml.

Évaporer l'éluat jusqu'à 2 à 3 ml à l'aide de l'évaporateur rotatif au bain marie à 30 °C. (*NB* = ne pas laisser évaporer à sec).

Transférer le résidu concentré dans un tube gradué de 4 ml, à l'aide d'une pipette Pasteur.

Rincer la fiole avec 1 ml de dichlorométhane et transférer le liquide de rinçage dans le tube. Concentrer l'échantillon à 1 ml sous un faible courant d'azote.

Transférer éventuellement le concentré dans une fiole du passeur d'échantillon pour l'analyse CG/SM.

F. **Analyse CG/SM**

a) Courbe de calibration

Injecter 1 µl de chacune des solutions standard d'étalonnage C f), en CG/SM. Faire le graphique du rapport des aires CE-CP pour la réponse de l'ion de m/z 62 sur l'axe des ordonnées et porter en abcisses la quantité de CE en ng/ml (soit 100, 200, 400, 800, 1600 ng/ml).

b) CE quantification

Injecter 1 µl d'extrait concentré de E dans le système CG/SM et calculer le rapport des aires CE-CP pour l'ion de m/z 62. Déterminer la concentration CE (ng/ml) dans l'extrait, en utilisant la courbe d'étalonnage standard interne. Calculer la concentration CE dans l'échantillon test (ng/ml) en divisant la quantité de CE (ng) dans l'extrait par le volume de l'échantillon test (ml).

c) Vérification de la pureté du CE

Déterminer si les réponses pour les ions de m/z 62, 74 et 89 apparaissent au temps de rétention du CE. Ces réponses sont les caractéristiques respectivement des principaux fragments $(M - C_2H_2)^+$ et $(M - CH_3)^+$ et de l'ion moléculaire (M). La présence de CE est confirmée si les proportions relatives de ces ions ne s'écartent pas de plus de 20 % des proportions pour le standard en CE. L'extrait peut avoir besoin d'être reconcentré pour obtenir une réponse suffisante pour l'ion de m/z 89.

G. **Analyse collaborative**

Le tableau 1 montre les résultats individuels pour l'échantillon d'entraînement pratique et pour les deux types de vins.

L'application du test de Cochran a eu pour conséquence l'élimination d'un seul couple de résultats, tant pour le vin dont le titre alcoométrique est supérieur à 14 % vol. que pour le vin dont le titre alcoométrique est inférieur ou égal à 14 % vol., chacun venant d'un laboratoire différent.

La reproductibilité relative tend à décroître avec l'accroissement de la concentration en carbamate d'éthyle.

Performance de la méthode pour la détermination du carbamate d'éthyle CE dans les boissons alcooliques par CG/SM

Échantillon	Moyenne de CE trouvé (ng/ml)	Récupération de CE ajouté (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Vin de plus de 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
Vin de moins de 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