VERORDNUNG (EG) Nr. 761/1999 DER KOMMISSION

vom 12. April 1999

zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 zur Festlegung gemeinsamer Analysemethoden für den Weinsektor

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 822/87 des Rates vom 16. März 1987 über die gemeinsame Marktorganisation für Wein [1], zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1627/98 [2], insbesondere auf Artikel 74,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die Analysemethoden für den Weinsektor werden im Anhang der Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 der Kommission [3], zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 822/97 [4], beschrieben. Die Analysemethode für D-Apfelsäure in Kapitel 20 hat sich als ungenau erwiesen, so daß ein neues, genaueres Verfahren entwickelt wurde. Für den Nachweis von Cyanverbindungen wurde eine neue, empfindlichere und leichter anzuwendende Methode gefunden. Für die Bestimmung von Ethylcarbamat in Wein wurde auf internationaler Ebene eine neue Methode ausgearbeitet. Alle drei Methoden wurden nach international anerkannten Kriterien validiert. Ihre Anwendung kann eine bessere Kontrolle der Qualität und Echtheit von Weinen sicherstellen und die infolge der Anwendung veralteter, unzuverlässiger Methoden etwa zu erwartende Rechtsstreitigkeiten vermeiden helfen. Die Arbeitsvorschriften dieser neuen Methoden wurde vom Internationalen Weinamt angenommen. Sie sollten daher in die betreffende Verordnung aufgenommen werden.

Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Wein —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Der Anhang der Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 wird wie folgt geändert:

1. Das Kapitel 20 „D-Apfelsäure“ wird durch Anhang I dieser Verordnung ersetzt.
2. Das Kapitel 38 „Cyanverbindungen“ wird durch Anhang II dieser Verordnung ersetzt.
3. Das Kapitel 44 in Anhang III dieser Verordnung wird angefügt.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am siebten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 12. April 1999

Für die Kommission

Franz FISCHLER

Mitglied der Kommission

[1] ABl. L 84 vom 27.3.1987, S. 1.
[2] ABl. L 210 vom 28.7.1998, S. 10.
[3] ABl. L 272 vom 3.10.1990, S. 1.
[4] ABl. L 117 vom 7.5.1997, S. 10.

ANHANG I

„20. D-APFELSÄURE

Enzymatische Bestimmung

1. PRINZIP

D-Apfelsäure (D-Malat) wird in Gegenwart von D-Malat-Dehydrogenase (D-MDH) durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) zu Oxalacetat oxidiert. Das anfallende Oxalacetat wird zu Pyruvat und Kohlenstoffdioxid umgewandelt.

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

Die durch die Zunahme der Extinktion bei einer Wellenlänge von 334, 340 bzw. 365 nm gemessene NADH-Bildung ist proportional zur vorhandenen Menge D-Malat.

2. REAGENZIEN

Im Handel sind folgende für etwa 30 Bestimmungen ausreichenden Reagenzienkits erhältlich:

a) Fläschchen 1 mit etwa 30 ml einer Lösung, die aus HEPES-Pufferlösung [4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure], pH = 9,0 und Stabilisatoren besteht;

b) Fläschchen 2 mit etwa 210 mg NAD-Lyophilisat;

c) Fläschchen 3 (drei Stück) mit D-MDH-Lyophilisat, jede etwa 8 Einheiten.

Ansetzen der Lösungen

1. Den Inhalt des Fläschchens 1 unverdünnt verwenden. Die Lösung vor Gebrauch auf 20—25 °C temperieren.

2. Inhalt des Fläschchens 2 in 4 ml bidestillierten Wassers lösen.

3. Inhalt eines der Fläschchen 3 in 0,6 ml bidestillierten Wassers lösen. Die Lösung vor Gebrauch auf 20—25 °C temperieren.

Haltbarkeit der Lösungen

Der Inhalt des Fläschchens 1 ist bei + 4 °C mindestens ein Jahr haltbar; Lösung 2 ist bei + 4 °C etwa drei Wochen und bei − 20 °C etwa 2 Monate haltbar; Lösung 3 ist bei + 4 °C fünf Tage haltbar.

3. GERÄTSCHAFTEN

3.1. Spektralphotometer zur Durchführung der Messungen bei 340 nm, NADH-Extinktionsmaximum, oder Spektrallinienphotometer zur Durchführung der Messungen bei 334 nm oder 365 nm. Da es sich um absolute Messungen handelt (keine Eichreihe, sondern im Verhältnis zum molaren Extinktionskoeffizienten von NADH) müssen die Richtigkeit der Wellenlänge und die Linearität der Extinktion gewährleistet sein.

3.2. Glas- oder Einwegküvetten, Schichtdicke 1 cm.

3.3. Mikropipetten von 0,01 und 2 ml.

4. VORBEREITUNG DER PROBE

Die Bestimmung von D-Malat erfolgt im allgemeinen direkt aus Wein ohne vorherige Entfärbung.

Da die Küvette 2 µg bis 50 µg D-Malat enthalten muß, sollte der Wein so verdünnt werden, daß die D-Malatkonzentration zwischen 0,02 und 0,5 g/l (Messung bei 365 nm) oder 0,02 und 0,3 g/l (Messung bei 340, 334 nm) liegt.

Verdünnungstafel:

Geschätzte Menge an D-Malat/Liter		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
Messung bei:			
340 oder 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. DURCHFÜHRUNG DER BESTIMMUNG

Das Spektralphotometer wird auf 340 nm eingestellt. die Extinktionsmessungen werden in 1-cm-Küvetten durchgeführt, wobei die Extinktion Null gegenüber Luft (kein Gefäß im Strahlengang) oder gegenüber Wasser eingestellt wird.

Die 1-cm-Küvetten werden beschickt mit:

	Leerwert	Probe
Lösung 1	1,00 ml	1,00 ml
Lösung 2	0,10 ml	0,10 ml
Bidestilliertes Wasser	1,80 ml	1,70 ml
Probe	—	0,10 ml

Mischen und nach ca. 6 Minuten die Extinktion des Leerwerts und der Probe (E_1) messen.

Zugabe von:

	Leerwert	Probe
Lösung 3	0,05 ml	0,05 ml

Mischen, Ende der Reaktion abwarten (ca. 20 Min.) und die Extinktion des Leerwerts und der Probe messen (E_2).

Die Extinktionsdifferenzen ($E_2 - E_1$) des Leerwerts (ΔE_T) und der Probe (ΔE_E) werden bestimmt. Die Extinktionsdifferenz des Leerwerts wird von der der Probe abgezogen: $\Delta E = \Delta E_E - \Delta E_T$.

Hinweis: Die für die Reaktion der Enzyme erforderliche Zeit kann von einer Charge zur anderen schwanken, sie wird hier nur als Beispiel angegeben. Es wird empfohlen, sie für jede Charge zu bestimmen.

D-Apfelsäure reagiert rasch. Eine zusätzliche Aktivität des Enzyms setzt auch Weinsäure um, wenn auch weniger rasch, so daß es mitunter zu einer schwachen Störreaktion kommt, die durch Extrapolierung (vgl. Anlage A) korrigiert werden kann.

6. BERECHNUNG

Die Konzentration in Milligramm je Liter wird nach folgender allgemeinen Formel berechnet:

$$C = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta E$$

V = Testvolumen in ml (hier 2,95 ml)
v = Probenvolumen in ml (hier 0,1 ml)
MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz (hier D-Apfelsäure = 134,09)
d = Schichtdicke der Küvette in cm (hier 1 cm)
ε = Extinktionskoeffizient von NADH:
bei 340 nm = 6,3 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
bei 365 nm = 3,4 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})
bei 334 nm = 6,18 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Wurde bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen, so ist das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Die D-Apfelsäurekonzentration wird in Milligramm je Liter (mg/l) ohne Dezimale angegeben.

7. ZUVERLÄSSIGKEITSBEDINGUNGEN

Die im Ringversuch ermittelten Präzisionsdaten sind in Anlage B zusammengefaßt. Die aus dem Ringversuch abgeleiteten Werte sind auf die Analytkonzentrationen und Matrizen anderer als der in Anlage B genannten mitunter nicht anwendbar.

7.1. **Wiederholgrenze (r)**

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial von einem Bearbeiter mit denselben Geräten innerhalb der kürzesten möglichen Zeitspanne erhält, wird die Wiederholgrenze r nicht häufiger als in 5 % der Fälle überschritten.

Die Wiederholbarkeit beträgt: r = 11 mg/l.

7.2. **Vergleichgrenze (R)**

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die für identisches Untersuchungsmaterial von zwei Laboratorien berichtet werden, wird die Vergleichgrenze R nicht häufiger als in 5 % der Fälle überschritten.

Die Vergleichbarkeit beträgt: R = 20 mg/l.

8. HINWEIS

zur Absicherung von ermittelten Gehalten an D-Malat unterhalb von 50 mg/l müssen die Ergebnisse im Notfall durch eine andere Analysemethode, der ein anderes Meßprinzip zugrundeliegt, bestätigt werden, z. B. mit dem Verfahren von Przyborski et al. (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 215-218.1993).

Das Probevolumen in der Küvette darf nicht größer sein als 0,1 ml, um etwaige Inhibitionen der Enzymaktivität durch Polyphenole auszuschließen.

Anlage A

Informationen über den Umgang mit Schleich-Reaktionen

‚Schleich'-Reaktionen gehen zumeist zurück auf Sekundärreaktionen des Enzyms in Gegenwart anderer in der Probenmatrix enthaltener Enzyme oder auf die Wechselwirkung mit einem oder mehreren Matrixelementen mit einem Kofaktor der Enzymreaktion.

Bei der normalen Reaktion erreicht die Extinktion nach einer bestimmten Zeit, die von der Reaktionsgeschwindigkeit des spezifischen Enzyms abhängt — in der Regel nach zehn bis zwanzig Minuten — einen konstanten Wert. Treten jedoch Sekundärreaktionen auf, so erreicht die Extinktion keinen konstanten Wert, sondern nimmt stetig zu; diesen Prozeß nennt man ‚Schleich'-Reaktion.

Wenn dieses Problem auftritt, empfiehlt es sich, nach der für die Standardlösung bis zum Erreichen ihrer endügltigen Extinktion erforderlichen Zeit die Extinktion der Lösung in regelmäßigen Abständen (alle 2 bis 5 Minuten) zu messen. Wenn eine konstante Extinktionszunahme erreicht ist, so sind 5 bis 6 Messungen und anschließend eine graphische oder rechnerische Extrapolierung durchzuführen, um die Extinktion zu bestimmen, die die Lösung zum Zeitpunkt des Zusetzens des letzten Enzyms hätte erreichen müssen (T0). Die extrapolierte Extinktionsdifferenz (Ef − Ei) wird zur Berechnung der Substratkonzentration verwendet.

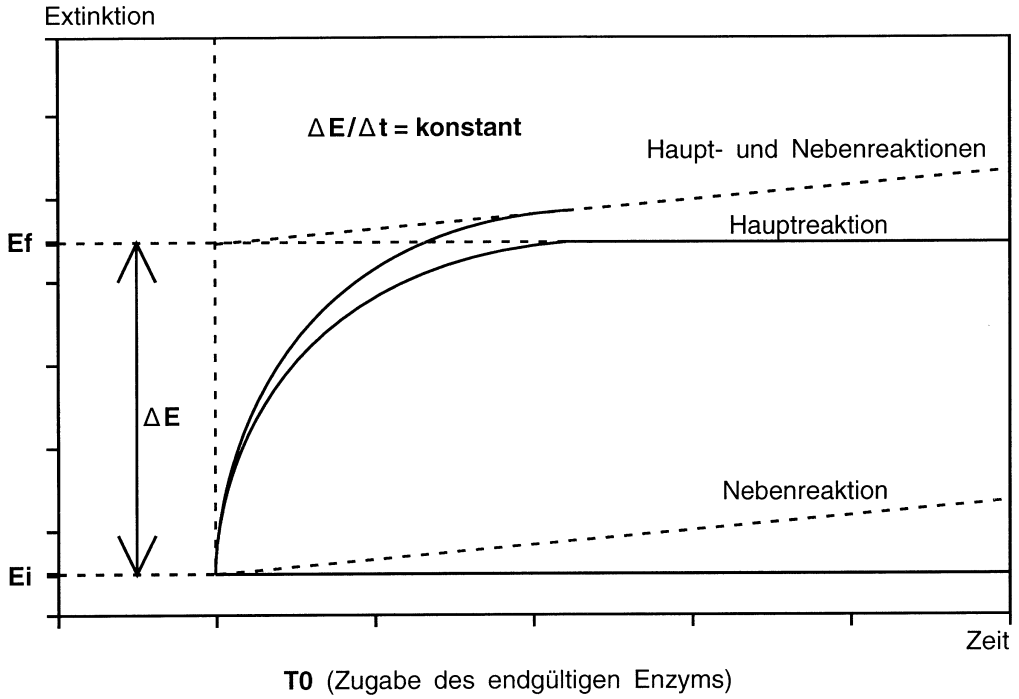


Abbildung 1: ‚Schleich'-Reaktion

Anlage B

Statistische Ergebnisse des Ringversuchs

Jahr des Ringversuchs: 1995
Anzahl der Laboratorien: 8
Anzahl der Proben: 5 mit Zusatz von D-Apfelsäure

Probe	A	B	C	D	E
Anzahl der nach Eliminieren der Ausreißer verbliebenen Laboratorien	7	8	7	8	7
Anzahl der Ausreißer (Laboratorien)	1	—	1	—	1
Anzahl der anerkannten Ergebnisse	35	41	35	41	36
Mittelwert ($\bar{\chi}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Wiederhol-Standardabweichung (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Relative Wiederhol-Standardabweichung (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Wiederholgrenze (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Vergleich-Standardabweichung (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Relative Vergleich-Standardabweichung (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Vergleichsgrenze (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Art der Proben:
A: Rotwein; B: Rotwein; C: Weißwein; D: Weißwein; E: Weißwein.“

ANHANG II

„38. CYANVERBINDUNGEN

(*Achtung:* Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit Chemikalien für Chloramin T, Pyridin, Kaliumcyanid, Salzsäure und Phosphorsäure beachten. Verbrauchte Mittel nach den jeweils geltenden Umweltschutzvorschriften entsorgen. Vorsicht mit bei der Destillation von angesäuertem Wein freigewordenem Kaliumcyanid.)

1. PRINZIP

Die gesamte Blausäure des Weins wird durch Säurehydrolyse freigesetzt und durch Destillation abgetrennt. Nach Reaktion mit Chloramin T und Pyridin wird der entstandene Glutacondialdehyd mit Hilfe der Blaufärbung, die sich bei Reaktion mit 1,3-Dimethylbarbitursäure zeigt, kolorimetrisch bestimmt.

2. GERÄTSCHAFTEN

2.1. **Destillationsapparatur**

Das gleiche Destillationsgerät wie zur Bestimmung von Weinalkohol verwenden.

2.2. Normalschliffkolben, 500 ml

2.3. Wasserbad, thermostatgesteuert, 20 °C

2.4. Spektralphotometer zur Messung der Extinktion bei 590 nm Wellenlänge

2.5. Glas- oder Einwegküvetten, 20 mm Schichtdicke.

3. REAGENZIEN

3.1. Phosphorsäure (H_3PO_4), 25%ig (m/v)

3.2. Chloramin-T-Lösung (C_7H_7 ClNNa $O_2S \cdot 3H_2O$), 3%ig (m/v)

3.3. 1,3-Dimethylbarbitursäurelösung: 3,658 g 1,3-Dimethylbarbitursäure ($C_6H_8N_2O_3$) werden in 15 ml Pyridin und 3 ml Salzsäure (ρ_{20} = 1,19 g/ml) gelöst und mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt

3.4. Kaliumcyanid (KCN)

3.5. Kaliumiodidlösung (KI) 10%ig (m/v)

3.6. Silbernitratlösung ($AgNO_3$), 0,1 M

4. DURCHFÜHRUNG DER BESTIMMUNG

4.1. **Destillation**

Der 500-ml-Kolben (2.2) wird mit 25 ml Wein, 50 ml destilliertem Wasser, 1 ml Phosphorsäure (3.l) und einigen Glasperlen beschickt. Danach wird der Kolben sofort an die Destillationsapparatur angeschlossen. Über ein ausgezogenes Verlängerungsrohr wird das Destillat direkt in eine mit 10 ml Wasser beschickte 50-ml-Meßvorlage übergeführt. Die Vorlage wird in Eiswasser gestellt. Es werden 30—35 ml Destillat überdestilliert bis in der Vorlage also ein Flüssigkeitsstand von ungefähr 45 ml erreicht ist.

Das ausgezogene Verlängerungsrohr des Kühlers wird mit einigen Millilitern destilliertem Wasser ausgespült, das Destillat wird auf 20 °C temperiert und die Vorlage bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

4.2. **Messung**

25 ml Destillat werden in einen 50-ml-Kolben mit Schliffstopfen überführt, mit 1 ml Chloramin-T-Lösung (3.2) versetzt und luftdicht verschlossen. Nach genau 60 Sekunden werden 3 ml 1,3-Dimethylbarbitursäure (3.3) zugefügt, der Kolben luftdicht verschlossen und 10 Minuten stehengelassen. Danach wird die Extinktion im Vergleich zum Standard (25 ml destilliertes Wasser anstelle vom 25 ml Destillat) bei einer Wellenlänge von 590 nm in Küvetten mit 20 mm Schichtdicke gemessen.

5. AUFSTELLEN DER EICHKURVE

5.1. **Argentometrische Titration von Kaliumcyanid**

Etwa 0,2 g KCN (3.4) werden genau eingewogen und in einem 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend werden 0,2 ml Kaliumiodidlösung (3.5) zugefügt und mit 0,1 M Silbernitratlösung (3.6) bis zum Eintreten einer stabilen Gelbfärbung titriert.

Da 1 ml der 0,l-M-Silbernitratlösung 13,2 mg KCN entsprechen, kann der KCN-Gehalt der Probe berechnet werden.

5.2. **Eichkurve**

5.2.1. *Vorbereitung der Eichlösungen*

Mit KCN stellt man entsprechend des nach 5.1 bestimmten Gehalts eine Lösung her, die 30 mg/l HCN enthält (30 mg HCN entsprechen 72,3 mg KCN). Diese Lösung wird 1:10 verdünnt.

Der 100-ml-Meßkolben wird jeweils mit 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 und 5,0 ml der verdünnten Eichlösung beschickt und bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die angesetzten Lösungen enthalten 30, 60, 90, 120 bzw. 150 µg/l Blausäure.

5.2.2. *Messung*

25 ml der angesetzten Lösungen entnehmen und gemäß Nummer 4.1 und 4.2 fortfahren.

Die mit diesen Eichlösungen gewonnenen Extinktionswerte werden in Beziehung zu den entsprechenden Blausäuregehalten als Gerade dargestellt, die durch den Nullpunkt verläuft.

6. ANGABE DER ERGEBNISSE

Der Blausäuregehalt wird in Mikrogramm je Liter (µg/l) ohne Dezimale angegeben.

6.1. **Berechnung**

Der Gehalt an Blausäure wird auf der Eichkurve abgelesen.

Falls verdünnt wurde, muß das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Wiederholbarkeit (r) und Vergleichbarkeit (R)

Weißwein = r = 3,1 µg/l, d. h. ungefähr 6 % bei x_i = 48,4 µg/l HCN
R = 12 µg/l, d. h. ungefähr 25 % bei x_i = 48,4 µg/l HCN
Rotwein = r = 6,4 µg/l, d. h. ungefähr 8 % bei x_i = 80,5 µg/l HCN
R = 23 µg/l, d. h. ungefähr 29 % bei x_i = 80,5 µg/l HCN.“

ANHANG III

44. BESTIMMUNG VON ETHYLCARBAMAT IN WEIN: SELEKTIVE, GASCHROMATOGRAPHISCHE/MASSENSPEKTROMETRISCHE BESTIMMUNG

(für die Bestimmung von Ethylcarbamat bei Konzentrationen zwischen 10 und 200 µg/l)

(*Achtung:* Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit Chemikalien für Ethanol, Aceton und karzinogene Stoffe (Ethylcarbamat und Dichlormethan) beachten. Verbrauchtes Lösungsmittel nach Maßgabe der jeweils geltenden Umweltschutzvorschriften entsorgen.)

A. **Prinzip der Methode**

Propylcarbamat wird einer Probe als innerer Standard zugesetzt, die Lösung wird mit Wasser verdünnt und in eine 50-ml-Feststoffextraktionssäule übergeführt. Ethylcarbamat und Propylcarbamat werden mit Dichlormethan eluiert.

Das Eluat wird in einem Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Das Konzentrat wird gaschromatographisch (GC) analysiert; die Bestimmung erfolgt massenspektrometrisch in fragmentometrischer SIM-Technik (Selected Ions Monitoring)

B. **Gerätschaften und Chromatographiebedingungen (als Beispiel)**

a) Gaschromatograph/Massenspektrometer (GC/MS) und eventuell ein Probengeber und ein Datenauswertungssystem oder Ähnliches.

Kieselgelsäule 30 m (*) × 0,25 mm ∅ int., 0,25 µm Belegung vom Typ Carbowax 20M.

Durchführung der Bestimmung: Einspritzblock 180 °C, Trägergas Helium 1 ml/min Vordruck bei 25 °C, Einspritzung nach dem Verfahren, „splitlos/split".

Temperaturführung: 40 °C, 0,75 min, dann mit 10 °C/min auf 60 °C, dann mit 3 °C/min auf 150 °C (**), dann auf 220 °C, dann 4,25 min auf 220 °C. Die spezifische Retentionszeit von Ethylcarbamat beträgt 23—27 min, die von Propylcarbamat 27—31 min.

Gaschromatograph/Spektrometer-lnterface (GC/MS): Transferlinie 220 °C. Massenspektrometer-Parameter manuell mit Perfluorotributylamin eingestellt und für eine niedrigere Massenempfindlichkeit optimiert, SlM-Technik, Lösungsmittel-Einwirkungszeit und Beginn der Aufnahme 22 min, Ionlebensdauer 100 ms.

b) Vakuumrotationsverdampfer oder Kuderna-Danish-Evaporator

(*Hinweis:* Die Ethylcarbamat-Wiederfindungsrate der Testprobe C(g) muß während des Verfahrens 90—110 % betragen.)

c) 300-ml-Kölbchen, birnenförmig, Einheits-Schliffstopfen

d) Eindickröhrchen — 4 ml, mit Teilung, mit teflonbeschichtetem Dichtring und Stopfen.

C. **Reagenzien**

a) Aceton — LC-Qualität

Hinweis: Vor Gebrauch jede Partie mittels GC/MS auf Fehlen eines Signals für Ionen m/e 62, 74 und 89 prüfen.

b) Dichloromethan

Hinweis: Vor Gebrauch jede Partie mittels GC/MS nach 200maligem Einengen auf Fehlen eines Signals für Ionen m/e 62, 74 und 89 prüfen.

c) Ethanol — wasserfrei

(*) Für bestimmte, besonders alkoholreiche Weine empfiehlt es sich mitunter, eine Kapillarsäule mit einer Länge von 50 m zu verwenden.

(**) Für bestimmte, besonders alkoholreiche Weine empfiehlt es sich mitunter, eine Temperatursteuerung von 2 °C pro Minute zu verwenden.

d) Ethylcarbamat (EC); Standardlösungen

1. Stammlösung — 1,00 mg/ml. 100 mg EC (≥ 99 % Reinheit) in ein volumetrisches 100-ml-Fläschchen einwiegen und mit Aceton verdünnen

2. Standard-Arbeitslösung — 10,0 µg/ml. Von der EC-Stammlösung 1 ml in ein 100-ml-Fläschchen überführen und bis zum Eichstrich mit Aceton verdünnen.

e) Propylcarbamat (PC), Standardlösungen

1. Stammlösung — 1,00 mg/ml. 100 mg PC (Reagenzqualität) in ein volumetrisches 100-ml-Fläschchen einwiegen und mit Aceton bis zum Eichstrich verdünnen.

2. Standard-Arbeitslösung — 10,0 µg/ml. 1 ml der PC-Stammlösung in ein volumetrisches 100-ml-Fläschchen überführen und mit Aceton bis zum Eichstrich verdünnen.

3. Innere PC-Standardlösung — 400 ng/ml. 4 ml der PC-Standard-Arbeitslösung in ein volumetrisches 100-ml-Fläschchen überführen und mit Wasser bis zum Eichstrich verdünnen.

f) Geeichte EC-PC-Standardlösungen

Die EC- und PC-Standard-Arbeitslösungen d) 2 und e) 2 mit Dichlormethan wie folgt verdünnen:

1. (100 ng EC und 400 ng PC)/ml,

2. (200 ng EC und 400 ng PC)/ml,

3. (400 ng EC und 400 ng PC)/ml,

4. (800 ng EC und 400 ng PC)/ml,

5. (1 600 ng EC und 400 ng PC)/ml.

g) Testprobe — 100 ng EC/ml in 40 % Ethanol.

1 ml der EC-Standard-Arbeitslösungen d) 2 in ein volumetrisches 100-ml-Fläschchen überführen mit 40 % Ethanol bis zum Eichstrich verdünnen.

h) Feststoffextraktionssäule — Einwegmaterial, mit Kieselgur vorgepackt, Fassungsvermögen 50 ml

Hinweis: Vor der Analyse jede Partie EC/PC-Extraktionssäulen auf Fehlen eines Signals für Ionen m/e 62, 74 und 89 prüfen. Von der Testprobe (g) 100 ng EC/ml vorbereiten. 5,00 ml der Testprobe wie unter D a), E und F beschrieben analysieren. Eine Wiederfindung von 90—110 ng EC/ml ist zufriedenstellend. Absorptionsmittel mit unregelmäßigem Teilchendurchmesser können sehr langsame Fließgeschwindigkeiten zur Folge haben, die die EC- und PC-Wiederfindung beeinträchtigen. Wenn nach mehreren Versuchen 90—110 % des Wertes der Testprobe nicht erreicht wird, ist zur EC-Bestimmung die Säule zu wechseln oder eine Eichkurve mit korrigierter Wiederfindung zu verwenden. Zur Erstellung der korrigierten Eichkurve sind Standardlösungen, wie unter f) beschrieben, mit 40 % Ethanol anstatt Dichlormethan anzusetzen.

Von der Standard-Eichlösung wird 1 ml wie unter D, E und F beschrieben analysiert.

Unter Verwendung des EC/PC-Verhältnisses der ausgezogenen Standards wird eine neue Eichkurve erstellt.

D. **Vorbereitung der Testprobe**

Von dem Testmaterial werden folgende Mengen in zwei gesonderte 100-ml-Bechergläser übergeführt:

a) Wein mit mehr als 14 % vol. Alkohol: 5,00 ± 0,01 ml.

b) Wein mit höchstens 14 % vol. Alkohol: 20,00 ± 0,01 ml.

Jedes Becherglas wird mit 1 ml innerer PC-Standardlösung C(e) (3) und soviel Wasser beschickt, daß ein Gesamtvolumen von 40 ml (bzw. 40 g) erreicht wird.

E. **Auszug**

Auszug unter Extraktionslüfter mit geeigneter Entlüftungsleistung durchführen.

Die Extraktionssäule wird mit der gemäß D angesetzten Probe beschickt.

Das Becherglas wird mit 10 ml Wasser gespült und das Spülwasser der Säule aufgegeben.

Die Flüssigkeit vier Minuten lang in die Säule einsickern lassen. Mit 2 × 80 ml Dichlormethan eluieren. Eluat in einem konischen 300-ml-Fläschchen auffangen.

Eluat bis auf 2 bis 3 ml mit Hilfe eines Umlaufverdampfers auf dem Wasserbad (30 °C) eindampfen (*Hinweis:* nicht bis zur Trockene eindampfen).

Den eingeengten Rückstand mittels Pasteur-Pipette in ein 4-ml-Röhrchen mit Meßteilung überführen.

Das Fläschchen mit 1 ml Dichlormethan spülen, Spülflüssigkeit in das Röhrchen überführen. Die Probe wird unter schwachem Stickstoffstrom bis auf 1 ml eingeengt.

Das Konzentrat eventuell in ein Fläschchen des Probengebers zwecks GC/MS-Analyse überführen.

F. **GC/MS-Analyse**

a) Eichkurve

Von jeder Standard-Eichlösung C f) wird jeweils 1 µl in den GC/MS eingespritzt. Zur graphischen Bestimmungen wird das EC-PC-Flächenverhältnisses als Massensignal auf das Ion m/e 62 auf der Ordinate und die EC-Menge in ng/ml (also 100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml) auf der Abszisse abgetragen.

b) Quantitative EC-Bestimmung

Von dem E-Konzentrat wird 1 µl in das GC/MS-System eingespritzt und das EC/PC-Flächenverhältnis für das Ion m/e 62 berechnet. Die EC-Konzentration (ng/ml) im Extrakt wird anhand der Eichkurve des inneren Standards bestimmt. Die EC-Konzentration in der Testprobe (ng/ml) errechnet sich durch Division der EC-Menge (ng) im Extrakt durch das Volumen der Testprobe (ml).

c) Prüfung der EC-Reinheit

Prüfen, ob die Massensignale für die Ionen m/e 62, 74 und 89 zum Zeitpunkt der EC-Retention auftreten. Diese Signale sind jeweils typisch für die wichtigsten Fragmente $(M - C_2H_2)^+$ und $(M - CH_3)^+$ und für das Molekülion (M). Das Vorhandensein von EC wird bestätigt, wenn die Verhältnisse dieser Ionen nicht größer ist als 20 % der Verhältnisse für den EC-Standard. Der Extrakt muß mitunter wieder eingeengt werden, um für das Ion m/e 89 ein ausreichendes Massensignal zu erzielen.

G. **Ringversuch**

Die Tabelle 1 zeigt die Einzelergebnisse für die Schlepp-Probe für die beiden Weinarten.

Die Anwendung des Cochran-Tests hat zur Eliminierung eines einzigen Ergebnispaares geführt, sowohl für Wein mit einem, Alkoholgehalt von über 14 % vol, als auch für Wein mit einem Alkoholgehalt von höchstens 14 % vol, die jeweils aus einem anderen Labor stammen.

Mit zunehmender Ethylcarbamatkonzentration nimmt die relative Vergleichbarkeit (RSD_R) tendenziell ab.

Leistung des Verfahrens zur GC/MS-Bestimmung von Ethylcarbamat EC in alkoholischen Getränken

Probe	Vorgefundener EC-Durchschnitt (ng/ml)	Wiederfindung von zugesetztem EC (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Wein mit über 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
Wein mit weniger als 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“