VERORDENING (EG) Nr. 761/1999 VAN DE COMMISSIE

van 12 april 1999

houdende wijziging van Verordening (EEG) nr. 2676/90 tot vaststelling van de in de wijnsector toe te passen communautaire analysemethoden

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Gemeenschap,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 822/87 van de Raad van 16 maart 1987 houdende een gemeenschappelijke ordening van de wijnmarkt [1], laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 1627/98 [2], en met name op artikel 74,

Overwegende dat in de bijlage bij Verordening (EEG) nr. 2676/90 van de Commissie [3], laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 822/97 [4], de in de wijnsector toe te passen communautaire analysemethoden zijn gedefinieerd; dat de in hoofdstuk 20 beschreven analysemethode met betrekking tot D-appelzuur niet erg nauwkeurig is gebleken en dat een nieuwe, nauwkeuriger methode is ontwikkeld; dat voor de analyse met betrekking tot cyaanverbindingen een nieuwe methode is ontwikkeld die gevoeliger en eenvoudiger toe te passen is; dat internationaal een nieuwe methode voor de bepaling van het gehalte aan ethylcarbamaat in wijn is ontwikkeld; dat deze drie nieuwe methoden volgens internationaal aanvaarde criteria zijn gevalideerd; dat door toepassing van deze methoden de kwaliteit en de echtheid van wijn beter kan worden gewaarborgd en dat geschillen als gevolg van de oude en weinig betrouwbare analysemethoden kunnen worden vermeden; dat de definitie van deze nieuwe methoden door het Office international de la vigne et du vin (OIV — Internationaal wijnbureau) is goedgekeurd; dat de betrokken methoden opgenomen moeten worden in de bijlage bij de betrokken verordening;

Overwegende dat de in deze verordening vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Comité van beheer voor wijn,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

De bijlage bij Verordening (EEG) nr. 2676/90 wordt als volgt gewijzigd:

1. Hoofdstuk 20 „D-appelzuur" wordt vervangen door bijlage I bij deze verordening.
2. Hoofdstuk 38 „Cyaanverbindingen" wordt vervangen door bijlage II bij deze verordening.
3. Hoofdstuk 44, dat voorkomt in bijlage III bij deze verordening, wordt aan de bijlage toegevoegd.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de zevende dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen.*

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 12 april 1999.

Voor de Commissie
Franz FISCHLER
Lid van de Commissie

---

[1] PB L 84 van 27.3.1987, blz. 1.
[2] PB L 210 van 28.7.1998, blz. 10.
[3] PB L 272 van 3.10.1990, blz. 1.
[4] PB L 117 van 7.5.1997, blz. 10.

BIJLAGE I

„20. D-APPELZUUR

(Bepaling met enzymatische methode)

1. PRINCIPE

In aanwezigheid van D-malaatdehydrogenase (D-MDH), wordt D-appelzuur (D-malaat) door nicotinezuuramide-adenine-dinucleotide (NAD) geoxideerd tot oxaalacetaat. Het gevormde oxaalacetaat wordt omgezet in pyruvaat en koolstofdioxide.

D-malaat + NAD^+ $\overset{\text{D-MDH}}{\rightleftharpoons}$ pyruvaat + CO_2 + NADH + H^+.

Het gevormde NADH, dat wordt bepaald door de extinctietoename te meten bij golflengte 334, 340 of 365 nm, is evenredig aan de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid D-malaat.

2. REAGENTIA

De reagentia die ongeveer 30 bepalingen mogelijk maken, zijn in de handel te verkrijgen in een koffertje met:

a) flesje 1 met ongeveer 30 ml Hepesbufferoplossing [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N′-2-ethaansulfonzuur] pH = 9,0 en stabilisatoren;

b) flesje 2 met ongeveer 210 mg gevriesdroogd NAD;

c) flesje 3 (drie stuks), met gevriesdroogd D-MDH, met ongeveer acht eenheden.

Voorbehandeling van de oplossingen

1. Gebruik de inhoud van flesje 1 onverdund. Breng de oplossing vóór het gebruik op 20-25 °C.

2. Los de inhoud van flesje 2 op in 4 ml dubbel gedestilleerd water.

3. Los de inhoud van één van de flesjes 3 op in 0,6 ml dubbel gedestilleerd water. Breng de oplossing vóór het gebruik op 20-25 °C.

Stabiliteit van de oplossingen

De inhoud van flesje 1 is ten minste één jaar houdbaar bij +4 °C; oplossing 2 is ongeveer drie weken houdbaar bij +4 °C en twee maanden bij −20 °C; oplossing 3 is vijf dagen houdbaar bij +4 °C.

3. APPARATUUR

3.1. Spectrofotometer waarmee de metingen kunnen worden verricht bij 340 nm, een golflengte waarbij een extinctiemaximum van NADH wordt bereikt. Indien geen dergelijke spectrofotometer beschikbaar is, kan een spectrofotometer met een discontinu spectrum worden gebruikt waarmee de metingen kunnen worden verricht bij 334 nm en 365 nm. Aangezien het om absolute extinctiemetingen gaat (zonder ijkcurve, maar met behulp van de extinctiecoëfficiënt van NADH), dienen de golflengteschaal en de extinctieschaal van het apparaat te worden gecontroleerd.

3.2. Glascuvetten of wegwerpcuvetten met een optische weglengte van 1 cm.

3.3. Micropipetten waarmee volumes van 0,01 tot 2 ml kunnen worden afgemeten.

4. VOORBEHANDELING VAN HET MONSTER

De bepaling van D-malaat gebeurt doorgaans rechtstreeks in de wijn zonder voorafgaande ontkleuring.

Aangezien de hoeveelheid D-malaat in de cuvet tussen 2 µg en 50 µg moet zijn, moet de wijn op zodanige wijze worden verdund dat het malaatgehalte tussen 0,02 en 0,5 g/l of 0,02 en 0,3 g/l komt te liggen (naar gelang van de gebruikte apparatuur).

Verdunningstabel

Geraamde hoeveelheid D-malaat/liter		Verdunning met water	Verdunningsfactor F
Meting bij:			
340 of 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. WERKWIJZE

De spectrofotometer wordt afgesteld op de golflengte 340 nm; de extinctiemetingen worden uitgevoerd in de cuvetten met een optische weglengte van 1 cm, de nulwaarde wordt ingesteld tegen lucht (geen cuvet in de lichtweg) of tegen water.

Breng in de cuvetten met een optische weglengte van 1 cm:

	Blanco-oplossing	Meetoplossing
Oplossing 1	1,00 ml	1,00 ml
Oplossing 2	0,10 ml	0,10 ml
Dubbel gedestilleerd water	1,80 ml	1,70 ml
Monsteroplossing	—	0,10 ml

Meng. Wacht ongeveer zes minuten en meet dan de extinctie van de blanco-oplossing en van de meetoplossing (A_1).

Voeg toe:

	Blanco-oplossing	Meetoplossing
Oplossing 3	0,05 ml	0,05 ml

Meng. Wacht tot het einde van de reactie (ongeveer 20 minuten) en meet de extinctie van de blanco-oplossing en van de meetoplossing (A_2).

Bepaal het extinctieverschil ($A_2 - A_1$) voor de blanco-oplossing (ΔA_T) en voor de meetoplossing (ΔA_E). Breng het extinctieverschil voor de blanco-oplossing in mindering op het extinctieverschil voor de meetoplossing: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Opmerking: De enzymactiviteit kan verschillen naar gelang van de partij. De hierboven vermelde tijd is slechts indicatief. Aanbevolen wordt de enzymactiviteit (en dus de benodigde tijd) voor elke partij afzonderlijk te bepalen.

D-appelzuur reageert snel. Door een bijkomende werking van het enzym wordt ook L-wijnsteenzuur omgezet, zij het veel langzamer. Er doet zich bijgevolg een geringe storende reactie voor die door extrapolatie kan worden gecorrigeerd (zie aanhangsel A).

6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

De concentratie in milligram per liter wordt berekend met de algemene formule:

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

waarin

V = totaal cuvetvolume in ml (hier 2,95 ml)

v = volume van het in bewerking genomen monster in ml (hier 0,1 ml)

MM = molecuulmassa van de te bepalen stof (hier D-appelzuur = 134,09)

d = optische weglengte van de cuvet in cm (hier 1 cm)

ε = extinctiecoëfficiënt van NADH:

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

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

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

Indien bij de voorbehandeling van het monster een verdunning is uitgevoerd, moet het resultaat met de verdunningsfactor worden vermenigvuldigd.

De concentratie D-appelzuur wordt aangegeven in milligram per liter (mg/l), zonder decimaal.

7. BETROUWBAARHEID

De details van de interlaboratoriumproef naar de betrouwbaarheid van de methode zijn samengevat in aanhangsel B. Het is mogelijk dat de uit de interlaboratoriumproef afgeleide waarden niet van toepassing zijn op andere dan de in aanhangsel B vermelde gamma's analytconcentraties en matrices.

7.1. **Herhaalbaarheid**

Het absolute verschil tussen twee afzonderlijke resultaten die zijn verkregen op identiek testmateriaal, door één persoon die dezelfde apparatuur heeft gebruikt, met een zo kort mogelijke tussentijd, mag de herhaalbaarheidswaarde r niet in meer dan 5 % van de gevallen overschrijden.

De waarde is: r = 11 mg/l.

7.2. **Reproduceerbaarheid**

Het absolute verschil tussen twee afzonderlijke resultaten die zijn verkregen op identiek testmateriaal in twee laboratoria mag de reproduceerbaarheidswaarde R niet in meer dan 5 % van de gevallen overschrijden.

De waarde is: R = 20 mg/l.

8. OPMERKINGEN

Gelet op de precisie van de methode dienen de D-appelzuurwaarden beneden 50 mg/l zo nodig te worden bevestigd door een andere analysemethode waarbij gebruik wordt gemaakt van een ander meetprincipe, bijv. dat van Przyborski et al. (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

De afgemeten hoeveelheid wijn in de cuvet mag niet meer bedragen dan 0,1 ml om eventuele remming van de enzymwerking door meerwaardige fenolen te vermijden.

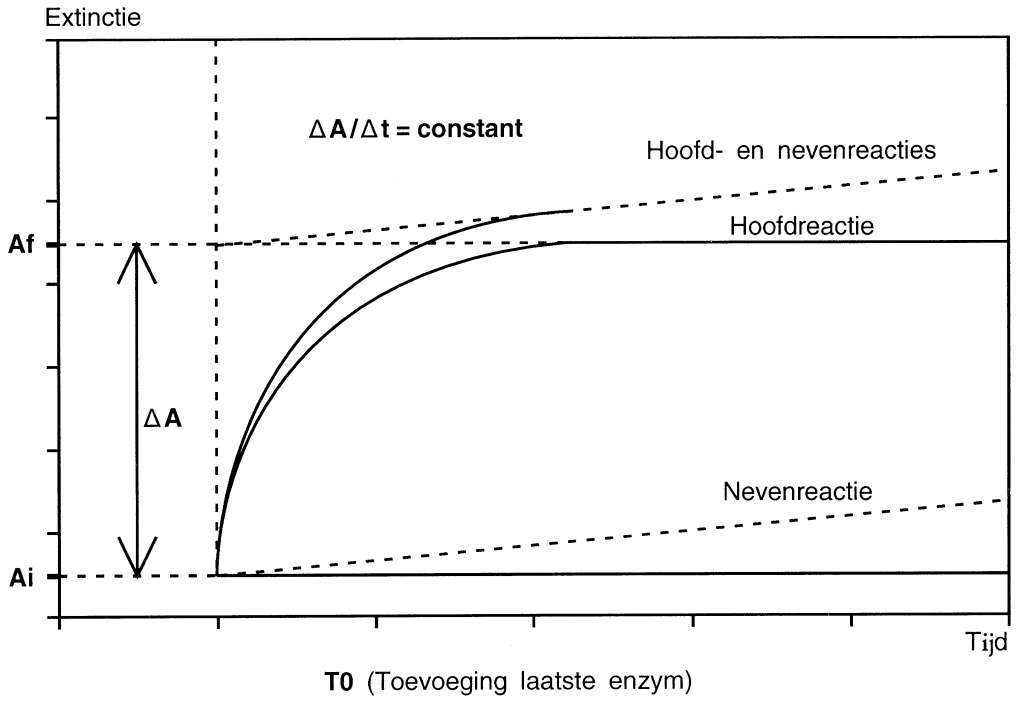
Aanhangsel A

Wat te doen in geval van storende reacties

Storende reacties zijn meestal het gevolg van secundaire reacties van het enzym, de aanwezigheid van andere enzymen in de matrix van het monster of de wisselwerking tussen één of verschillende elementen van de matrix en een CO-factor van de enzymreactie.

Bij de normale reactie bereikt de extinctie na een bepaalde tijd een constante waarde, doorgaans na 10 à 20 minuten, afhankelijk van de snelheid van de specifieke enzymreactie. Wanneer er echter secundaire reacties optreden, bereikt de extinctie geen constante waarde, maar neemt ze gelijkmatig toe met de tijd. Dat proces wordt een „storende reactie" genoemd.

Indien een dergelijk probleem optreedt, wordt, nadat de standaardoplossing haar definitieve extinctie heeft kunnen bereiken, de extinctie van de oplossing met regelmatige tussenpozen (2 tot 5 minuten) gemeten. Wanneer de extinctie gelijkmatig toeneemt, worden vijf tot zes metingen uitgevoerd en wordt vervolgens een grafische of rekenkundige extrapolatie gemaakt om de extinctie te verkrijgen die de oplossing zou hebben op het ogenblik dat het laatste enzym is toegevoegd (T0). Het geëxtrapoleerde extinctieverschil op dat ogenblik (Af − Ai) wordt gebruikt bij de berekening van het substraatgehalte.



Figuur 1: Storende reactie

Aanhangsel B

Statistische resultaten van de interlaboratoriumproef

Jaar waarin de interlaboratoriumproef is uitgevoerd: 1995
Aantal laboratoria: 8
Aantal monsters: vijf met toevoeging van D-appelzuur

Monster	A	B	C	D	E
Aantal overgebleven laboratoria na eliminatie van de laboratoria die abnormale resultaten hebben voorgelegd	7	8	7	8	7
Aantal laboratoria die abnormale resultaten hebben voorgelegd	1	—	1	—	1
Aantal aanvaarde resultaten	35	41	35	41	36
Gemiddelde waarde ($\bar{\chi}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Standaardafwijking herhaalbaarheid (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Relatieve standaardafwijking herhaalbaarheid (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Herhaalbaarheidsgrens (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Standaardafwijking reproduceerbaarheid (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Relatieve standaardafwijking reproduceerbaarheid (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Reproduceerbaarheidsgrens (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Soorten monsters:
A: rode wijn; B: rode wijn; C: witte wijn; D: witte wijn; E: witte wijn.”

BIJLAGE II

„38. **CYAANVERBINDINGEN**

(*NB:* Respecteer de veiligheidsvoorschriften inzake de omgang met chemische producten, zoals chloramine T, pyridine, kaliumcyanide, zoutzuur en fosforzuur. De gebruikte producten moeten op adequate wijze in overeenstemming met de geldende milieuvoorschriften worden opgeruimd. Let op voor waterstofcyanide dat vrijkomt bij de destillatie van aangezuurde wijn.)

1. PRINCIPE

Vrij en totaal waterstofcyanide in de wijn wordt vrijgemaakt door middel van zure hydrolyse en gescheiden door middel van destillatie. Na reactie met chloramine T en pyridine, wordt het gevormde glutacondialdehyd colorimetrisch bepaald door de blauwkleuring met 1,3-dimethylbarbituurzuur.

2. APPARATUUR

2.1. **Destillatieopstelling**

Gebruik de destillatieopstelling die is beschreven in de procedure voor de bepaling van het alcoholvolumegehalte in wijn.

2.2. Kolf van 500 ml met genormaliseerd slijpstuk.

2.3. Waterbad, met een op 20 °C ingestelde thermostaat.

2.4. Spectrofotometer waarmee extinctiemetingen kunnen worden uitgevoerd bij een golflengte van 590 nm.

2.5. Glascuvetten of wegwerpcuvetten met een optische weglengte van 20 mm.

3. REAGENTIA

3.1. Fosforzuur (H_3PO_4), 25 % (m/v).

3.2. Chloramine T-oplossing (C_7H_7 ClNNa $O_2S.3H_2O$) 3 % (m/v).

3.3. 1,3-Dimethylbarbituurzuuroplossing: los 3,658 g 1,3-dimethylbarbituurzuur ($C_6H_8N_2O_3$) op in 15 ml pyridine en 3 ml zoutzuur (ρ_{20} = 1,19 g/ml) en vul met gedestilleerd water aan tot 50 ml.

3.4. Kaliumcyanide (KCN).

3.5. Kaliumjodideoplossing (KI) 10 % (m/v).

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

4. WERKWIJZE

4.1. **Destillatie:**

Breng 25 ml wijn, 50 ml gedestilleerd water, 1 ml fosforzuur (3.1) en enkele glasparels in de destillatiekolf van 500 ml (2.2). Plaats de kolf onmiddellijk in de destillatieopstelling. Breng het destillaat met behulp van een dunne buis in een maatkolf van 50 ml die 10 ml water bevat. De maatkolf staat in ijswater. Vang 30-35 ml destillaat op (de maatkolf bevat dus in totaal ongeveer 45 ml vloeistof).

Was de dunne buis van de koeler met enkele milliliters gedestilleerd water, breng het destillaat op 20 °C en vul aan tot de merkstreep met gedestilleerd water.

4.2. **Meting**

Breng 25 ml destillaat in een erlenmeyer van 50 ml met slijpstuk; voeg 1 ml chloramine T-oplossing toe (3.2) en sluit hermetisch af. Voeg na precies 60 seconden 3 ml 1,3 dimethyl-barbituurzuuroplossing (3.3) toe, sluit hermetisch af en laat gedurende tien minuten staan. Meet vervolgens de extinctie ten opzichte van de blanco-oplossing (25 ml gedestilleerd water in plaats van 25 ml destillaat) bij een golflengte 590 nm in de cuvetten met een optische weglengte van 20 mm.

5. BEPALING VAN DE IJKCURVE

5.1. **Argentometrische titratie van kaliumcyanide**

Los in een maatkolf van 300 ml ongeveer 0,2 g KCN (3.4), nauwkeurig afgewogen, op in 100 ml gedestilleerd water. Voeg 0,2 ml kaliumjodideoplossing (3.5) toe en titreer met de 0,1 M zilvernitraatoplossing (3.6) tot een stabiele geelkleuring is verkregen.

1 ml 0,1 M zilvernitraatoplossing komt overeen met 13,2 mg KCN. Bereken de titer van de KCN-oplossing.

5.2. **IJkcurve**

5.2.1. *Bereiding van de ijkoplossingen*

Bereid, op basis van de overeenkomstig punt 5.1 bepaalde KCN-titer, een ijkoplossing die per liter 30 mg waterstofcyanide bevat (30 mg HCN ≅ 72,3 mg KCN). Verdun deze oplossing 1/10.

Breng 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 en 5,0 ml van de verdunde ijkoplossing in maatkolven van 100 ml en vul tot de merkstreep aan met gedestilleerd water. De aldus bereide oplossingen hebben een waterstofcyanidegehalte van respectievelijk 30, 60, 90, 120 en 150 µg/l.

5.2.2. *Bepaling*

Neem 25 ml van de aldus verkregen oplossingen en ga verder zoals vermeld in de punten 4.1 en 4.2.

Wanneer de extinctiewaarden die zijn verkregen met deze ijkoplossingen, worden uitgezet tegen de overeenkomstige waterstofcyanidegehaltes, levert dit een rechte lijn op die door de oorsprong gaat.

6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Waterstofcyanide wordt uitgedrukt in microgram per liter (µg/l), zonder decimaal.

6.1. **Berekening**

Lees het waterstofcyanidegehalte af uit de ijklijn. Indien een verdunning is uitgevoerd, moet het resultaat met de verdunningsfactor worden vermenigvuldigd.

Herhaalbaarheid (r) en reproduceerbaarheid (R)

Witte wijn = r = 3,1 µg/l, d.i. ongeveer 6 % . x_i

R = 12 µg/l, d.i. ongeveer 25 % . x_i.

Rode wijn = r = 6,4 µg/l, d.i. ongeveer 8 % . x_i

R = 23 µg/l, d.i. ongeveer 29 % . x_i.

x_i = gemiddeld HCN-gehalte van wijn

x_i = 48,4 µg/l voor witte wijn

x_i = 80,5 µg/l voor rode wijn."

BIJLAGE III

44. BEPALING VAN ETHYLCARBAMAAT IN WIJN: SELECTIEVE DETECTIEMETHODE MET BEHULP VAN GASCHROMATOGRAFIE/MASSASPECTROMETRIE

(Van toepassing voor de bepaling van ethylcarbamaatconcentraties tussen 10 en 200 µg/l.)

(*NB:* Respecteer de veiligheidsvoorschriften inzake de omgang met chemische producten, zoals ethanol en aceton en kankerverwekkende producten zoals ethylcarbamaat en dichloormethaan. De gebruikte oplosmiddelen moeten op adequate wijze in overeenstemming met de geldende milieuvoorschriften worden opgeruimd.)

A. **Principe van de methode**

Propylcarbamaat wordt aan een monster toegevoegd als interne standaard en de oplossing wordt verdund met water en in een extractiekolom (vaste fase) van 50 ml gebracht. Ethylcarbamaat en propylcarbamaat worden geëlueerd met dichloormethaan.

Het eluaat wordt geconcentreerd met behulp van een roterende vacuümverdamper. Het concentraat wordt geanalyseerd met gaschromatografie (GC). De detectie gebeurt door massaspectrometrie met SIM (selected ion monitoring).

B. **Apparatuur en chromatografische omstandigheden (bij wijze van voorbeeld)**

a) Gaschromatograaf/massaspectrometer (GC/MS) en eventueel een monsterwisselaar en een gegevensverwerkingssysteem of equivalent.

Capillaire silicakolom 30 m (*) × 0,25 mm int. ∅, 0,25 µm film van het type Carbowax 20M.

Werkwijze: Injectortemperatuur 180 °C, draaggas helium — 1 ml/min. en 25 °C, injectiemethode „Splitless/split".

Temperatuurprogramma: 40 °C gedurende 0,75 min., vervolgens programmering met 10 °C/min. tot 60 °C, vervolgens 3 °C/min. tot 150 °C (**), opvoeren tot 220 °C en vervolgens gedurende 4,25 min. 220 °C aanhouden. De specifieke retentietijd van ethylcarbamaat bedraagt 23-27 min., die van propylcarbamaat bedraagt 27-31 min.

Interface gaschromatograaf/spectrometer (GC/MS): koppeling 220 °C. Parameters van de massaspectrometer handmatig ingesteld met perfluortributylamine en geoptimaliseerd voor een lagere massagevoeligheid, bepaling met SIM, oplosmiddel- en groepstarttijd 22 min., verblijfstijd/ion 100 ms.

b) Roterende vacuümverdamper of concentratiesysteem van het type Kuderna Danish.

(*NB:* Het terugvindingspercentage van ethylcarbamaat in het monster C(g) moet gedurende het proces tussen 90 en 110 % liggen).

c) Kolf — peervormig, 300 ml, één hals met slijpstuk.

d) Concentratiebuis — 4 ml, met schaalverdeling, met teflonmanchet en stop.

C. **Reagentia**

a) Aceton — LC-kwaliteit.

NB: Elke charge voor gebruik met GC/MS controleren op afwezigheid van respons voor de ionen met m/z 62, 74 en 89.

b) Dichloormethaan.

NB: Elke charge voor gebruik met GC/MS na concentratie met factor 200 analyseren voor controle op afwezigheid van respons voor de ionen met m/z 62, 74 en 89.

c) Ethanol — watervrij.

(*) Voor bepaalde rijke wijnen kan het wenselijk zijn een capillaire kolom met een lengte van 50 m te gebruiken.
(**) Voor bepaalde rijke wijnen kan het wenselijk zijn een temperatuurprogrammering uit te voeren van 2 °C /min.

d) Ethylcarbamaat (EC); standaardoplossingen.

1. Stamoplossing — 1,00 mg/ml. Weeg 100 mg EC (zuiverheid ≥ 99 %) af in een maatkolf van 100 ml en verdun met aceton.

2. Werkoplossing — 10,0 µg/ml. Breng 1 ml stamoplossing EC in een maatkolf van 100 ml en verdun met aceton tot aan de maatstreep.

e) Propylcarbamaat (PC), standaardoplossingen.

1. Stamoplossing — 1,00 mg/ml. Weeg 100 mg PC (p.a.) af in een maatkolf van 100 ml en verdun met aceton tot aan de maatstreep.

2. Werkoplossing — 10,0 µg/ml. Breng 1 ml stamoplossing PC in een maatkolf van 100 ml en verdun met aceton tot aan de maatstreep.

3. Interne standaardoplossing PC — 400 ng/ml. Breng 4 ml werkoplossing PC in een maatkolf van 100 ml en verdun met water tot aan de maatstreep.

f) IJkoplossingen EC — PC.

Verdun de werkoplossingen EC (onder d), punt 2), en PC (onder e), punt 2) met dichloormethaan om het volgende te verkrijgen:

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

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

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

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

5. (1600 ng EC en 400 ng PC)/ml.

g) Proefmonster — 100 ng EC/ml in 40 % ethanol.

Breng 1 ml van de werkoplossingen EC, (onder d), punt 2) in een maatkolf van 100 ml en verdun met 40 % ethanol tot aan de maatstreep.

h) Extractiekolom vaste fase — Wegwerpmateriaal, voorgepakt met diatomeeënaarde, inhoud 50 ml.

N.B: Alvorens de analyse uit te voeren, moet elke charge extractiekolommen worden gecontroleerd op recovery van EC en PC en op de afwezigheid van respons voor de ionen met m/z 62, 74 en 89. Bereid een proefmonster met 100 ng EC/ml (onder g). Analyseer 5,00 ml van het proefmonster zoals vermeld in de punten D, onder a), E en F. Een recovery van 90-110 ng EC/ml is voldoende. Absorptiematerialen waarvan de diameter van de deeltjes onregelmatig is, kunnen heel lage debieten veroorzaken die nadelige gevolgen hebben voor de recovery van EC en PC. Wanneer na verschillende proeven een recovery van 90-110 % van het proefmonster niet wordt bereikt, moet voor de kwantitatieve bepaling van EC een andere kolom worden gebruikt of een voor de recovery gecorrigeerde ijkcurve. Om de gecorrigeerde ijkcurve te bepalen, worden standaardoplossingen bereid zoals vermeld onder f) met 40 % ethanol in plaats van dichloormethaan.

Analyseer 1 ml ijkoplossing zoals vermeld in de punten D, E en F.

Bepaal op basis van de EC/PC-verhouding van de geëxtraheerde standaardoplossingen een nieuwe ijkcurve.

D. **Bereiding van het proefmonster**

Breng de volgende hoeveelheden proefmateriaal in twee afzonderlijke bekerglazen van 100 ml:

a) Wijnen met een alcoholpercentage hoger dan 14 % (v/v): 5,00 ml ± 0,01 ml.

b) Wijnen met een alcoholpercentage tot 14 % (v/v): 20,00 ml ± 0,01 ml.

Voeg aan elk bekerglas 1 ml interne standaardoplossing PC volgens punt C, onder e), punt 3, toe en vul met water aan tot een totaalvolume van 40 ml (of 40 g).

E. **Extractie**

De extractie dient te gebeuren in een zuurkast met adequate ventilatie.

Breng de volgens punt D bereide oplossing op de extractiekolom.

Spoel het bekerglas met 10 ml water en breng het spoelwater op de kolom.

Laat de vloeistof gedurende vier minuten in de kolom zakken. Elueer met 2 × 80 ml dichloormethaan. Vang het eluaat op in een erlenmeyer van 300 ml.

Damp het eluaat met behulp van de roterende verdamper op een waterbad van 30 °C in tot 2 à 3 ml. (*NB:* Niet droogdampen.)

Breng het geconcentreerde residu met een pasteur-pipet over in een buis met een maatverdeling van 4 ml.

Spoel de erlenmeyer met 1 ml dichloormethaan en breng het spoelwater in de buis. Concentreer het monster tot 1 ml onder een zwakke stroom stikstof.

Breng het concentraat over in een monsterwisselaarbuis voor de GC/MS-analyse.

F. **GC/MS-analyse**

a) IJkcurve

Injecteer 1 µl van elk van de ijkoplossingen volgens C (f) in de GC/MS. Zet in een curve de verhouding van de EC-PC-oppervlakken van de respons voor het ion met m/z 62 uit op de y-as en de hoeveelheid EC in ng/ml op de x-as (m.a.w. 100, 200, 400, 800 en 1600 ng/ml).

b) EC-bepaling

Injecteer 1 µl concentraatextract volgens E in het GC/MS-systeem en bereken de verhouding van de EC-PC-oppervlakken voor het ion met m/z 62. Bepaal de EC-concentratie (ng/ml) in het extract met behulp van de ijkcurve voor de interne standaard. Bereken de EC-concentratie in het proefmonster (ng/ml) door de hoeveelheid EC (ng) in het extract te delen door het volume van het proefmonster (ml).

c) Controle van de zuiverheid van EC

Ga na of de respons voor de ionen met m/z 62, 74 en 89 overeenkomt met de retentietijd van EC. Deze responsen zijn karakteristiek voor respectievelijk de belangrijkste fragmenten $(M - C_2H_2)^+$ en $(M - CH_3)^+$ en het molecuulion (M). De aanwezigheid van EC wordt bevestigd wanneer de relatieve verhoudingen van deze ionen niet meer dan 20 % van de verhoudingen voor de EC-standaard verschillen. Het kan zijn dat het extract opnieuw moet worden geconcentreerd om een afdoende respons te krijgen voor het ion met m/z 89.

G. **Interlaboratoriumproef**

De tabel geeft de afzonderlijke resultaten voor het proefmonster en voor de twee soorten wijn.

De toepassing van de Cochran-toets heeft geleid tot eliminatie van één enkel koppel resultaten, zowel voor wijnen met een alcoholgehalte hoger dan 14 % (v/v) als voor wijnen met een alcoholgehalte lager dan of gelijk aan 14 % (v/v), elk afkomstig van een ander laboratorium.

De relatieve reproduceerbaarheid heeft de neiging af te nemen naarmate het ethylcarbamaatgehalte toeneemt.

Resultaat van de methode voor de bepaling van ethylcarbamaat (EC) in alcolhoudende dranken met behulp van GC/MS

Monster	Gemiddeld bepaald EC-gehalte (ng/ml)	Recovery toegevoegd (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Wijn van meer dan 14 % (v/v)	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
Wijn van de minder dan 14 % (v/v)	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