KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 761/1999

af 12. april 1999

om ændring af forordning (EØF) nr. 2676/90 om fastsættelse af fælles analysemetoder for vin

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 822/87 af 16. marts 1987 om den fælles markedsordning for vin ([1]), senest ændret ved forordning (EF) nr. 1627/98 ([2]), særlig artikel 74, og

ud fra følgende betragtninger:

I Kommissionens forordning (EØF) nr. 2676/90 ([3]), senest ændret ved forordning (EF) nr. 822/97 ([4]), beskrives i bilaget en række analysemetoder; metoden for analyse for D-æblesyre i kapitel 20 har vist sig unøjagtig, og der er udviklet en ny og mere præcis metode; der er udviklet en ny analysemetode for cyanider, som er mere følsom og lettere at udføre; der er på internationalt plan udviklet en ny metode til måling af ethylcarbamat i vin; de nævnte tre metoder er valideret efter internationalt anerkendte kriterier; ved at benytte disse metoder kan vins kvalitet og ægthed bedre kontrolleres, og man kan undgå tvister som følge af, at der benyttes gamle upålidelige analysemetoder; beskrivelsen af de nye metoder er vedtaget af Det Internationale Vinkontor; de nye metoder bør indarbejdes i den pågældende forordning;

de i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Forvaltningskomitéen for Vin —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

I bilaget til forordning (EØF) nr. 2676/90 foretages følgende ændringer:

1) Kapitel 20 »D-æblesyre« affattes som vist i bilag I.
2) Kapitel 38 »Cyanidderivater« affattes som vist i bilag II.
3) Der tilføjes et nyt kapitel 44 affattet som vist i bilag III.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på syvendedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende.*

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 12. april 1999.

På Kommissionens vegne
Franz FISCHLER
Medlem af Kommissionen

([1]) EFT L 84 af 27.3.1987, s. 1.
([2]) EFT L 210 af 28.7.1998, s. 10.
([3]) EFT L 272 af 3.10.1990, s. 1.
([4]) EFT L 117 af 7.5.1997, s. 10.

BILAG I

»**20. D-ÆBLESYRE**

(Enzymatisk metode)

1. PRINCIP

Under tilstedeværelse af D-malat-dehydrogenase (D-MDH) oxideres D-æblesyre (D-malat) til oxalacetat ved hjælp af nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD). Den dannede oxalacetat omdannes til pyruvat og carbondioxid.

D-malat + NAD^+ $\overset{\text{D-MDH}}{\rightleftharpoons}$ pyruvat + CO_2 + NADH + H^+

Den dannede mængde NADH er proportional med indholdet af D-malat og måles ved forøgelse af absorbansen ved bølgelængden 334, 340 eller 365 nm.

2. REAGENSER

I handelen findes der testsæt med reagenser til ca. 30 målinger, og de indeholder følgende:

a) Flaske 1 med ca. 30 ml Hepes-bufferopløsning (N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsyre) med pH = 9,0 og tilsat stabilisatorer.

b) Flaske 2 med ca. 210 mg frysetørret NAD.

c) Flaske 3 med frysetørret D-MDH, 3 flasker hver indeholdende ca. 8 U.

Fremstilling af opløsninger

1) Indholdet af flaske 1 anvendes ufortyndet. Opløsningen skal have en temperatur på 20-25 °C inden brugen.

2) Indholdet af flaske 2 opløses i 4 ml dobbeltdestilleret vand.

3) Indholdet af en af flaskerne 3 opløses i 0,6 ml dobbeltdestilleret vand. Opløsningen skal have en temperatur på 20-25 °C inden brugen.

Opløsningernes stabilitet

Indholdet af flaske 1 kan holde sig i mindst et år ved +4 °C. Opløsning 2 kan holde sig i ca. tre uger ved +4 °C og i 2 måneder ved −20 °C. Opløsning 3 kan holde sig i 5 dage ved +4 °C.

3. APPARATUR

3.1. Spektrofotometer, hvormed der kan måles ved 340 nm, som er absorptionsmaksimum for NADH. I mangel heraf kan der benyttes et fotometer med diskontinuert spektrum, hvormed der kan måles ved 334 nm og 365 nm. Da der er tale om absolutte absorbansmålinger (ingen kalibrering, men reference til NADH's ekstinktionskoefficient), skal apparatets bølgelængde- og absorbansskala kontrolleres.

3.2. Glaskuvetter med en lysvej på 1 cm eller engangskuvetter.

3.3. Mikropipetter, hvormed der kan udtages væskemængder på 0,01-2 ml.

4. PRØVEFORBEREDELSE

Mængden af D-malat bestemmes normalt direkte på vinprøven uden forudgående affarvning.

Da mængden af D-malat i kuvetten skal være mellem 2 og 50 µg, fortyndes vinen til en malatkoncentration på henholdsvis 0,02-0,5 g/l eller 0,02-0,3 g/l afhængigt af, hvilket apparat der benyttes.

Fortyndingstabel

Skønnet indhold af D-malat pr. liter		Fortynding med vand	Fortyndingsfaktor
måling ved			
340 eller 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. FREMGANGSMÅDE

Når spektrofotometeret er indstillet på bølgelængden 340 nm, måles absorbansen i kuvetter med en lysvej på 1 cm, idet der som nulabsorbans benyttes luft (ingen kuvette i strålegangen) eller vand.

Til to kuvetter overføres der følgende:

	Referencekuvette	Prøvekuvette
Opløsning 1	1,00 ml	1,00 ml
Opløsning 2	0,10 ml	0,10 ml
Dobbeltdestilleret vand	1,80 ml	1,70 ml
Prøve	—	0,10 ml

Bland og aflæs efter ca. 6 min. reference- og prøveopløsningernes absorbans (A_1).

Tilsætning af:

	Reference	Prøve
Opløsning 3	0,05 ml	0,05 ml

Bland og vent indtil reaktionen er afsluttet (ca. 20 min.), og aflæs så reference- og prøveopløsningernes absorbans (A_2).

Beregn absorbansforskellen ($A_2 - A_1$) for referenceopløsningen (ΔA_T) og prøveopløsningen (ΔA_E). Beregn endvidere forskellen mellem disse absorbansforskelle: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

NB: Den tid, enzymet skal virke i, kan variere fra parti til parti. Det anførte tidsrum er kun vejledende. Det anbefales at bestemme den for hvert parti.

D-æblesyre reagerer hurtigt. Med overskydende enzymaktivitet vil også L-vinsyre blive omdannet, men meget langsommere. Det er grunden til, at der optræder en svag sidereaktion, som der kan korrigeres for ved ekstrapolation (se tillæg A).

6. ANGIVELSE AF RESULTATER

Koncentrationen i mg pr. liter beregnes på følgende måde:

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

hvor

V = testvolumen i ml (her 2,95 ml)

v = prøvevolumen (her 0,1 ml)

MW = molekylmassen af det stof, der skal bestemmes (her 134,09 for æblesyre)

d = kuvettens lysvej i cm (her 1 cm)

ε = NADH's ekstinktionkoefficient, nemlig

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

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

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

Hvis prøven er fortyndet under prøveforberedelsen, multipliceres resultatet med fortyndingsfaktoren F.

Koncentrationen af D-æblesyre angives i mg pr. liter (mg/l) uden decimaler.

7. NØJAGTIGHED

Tillæg B indeholder nærmere oplysninger om metodens nøjagtighed. De værdier, der er udledt af interkalibreringen, gælder muligvis kun for de analytkoncentrationer og matricer, som er anført i tillæg B.

7.1. **Repeterbarhed**

Den absolutte forskel mellem to enkeltresultater, der er opnået af samme person med samme apparatur på samme prøvemateriale og inden for kort tid, må ikke overstige repeterbarhedsværdien r i mere end 5 % af tilfældene.

r = 11 mg/l.

7.2. **Reproducerbarhed**

Den absolutte forskel mellem to enkeltresultater, der er opnået af to forskellige laboratorier på samme prøvemateriale, må ikke overstige reproducerbarhedsværdien R i mere end 5 % af tilfældene.

R = 20 mg/l.

8. BEMÆRKNINGER

I betragtning af metodens begrænsede nøjagtighed skal D-æblesyreresultater under 50 mg/l om nødvendigt bekræftes ved en anden analysemetode, der bygger på et andet princip, f.eks. Przyborskis metode (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218).

Mængden af vin i kuvetten må ikke overstige 0,1 ml; derved undgås, at enzymaktiviteten eventuelt hæmmes af polyphenoler.

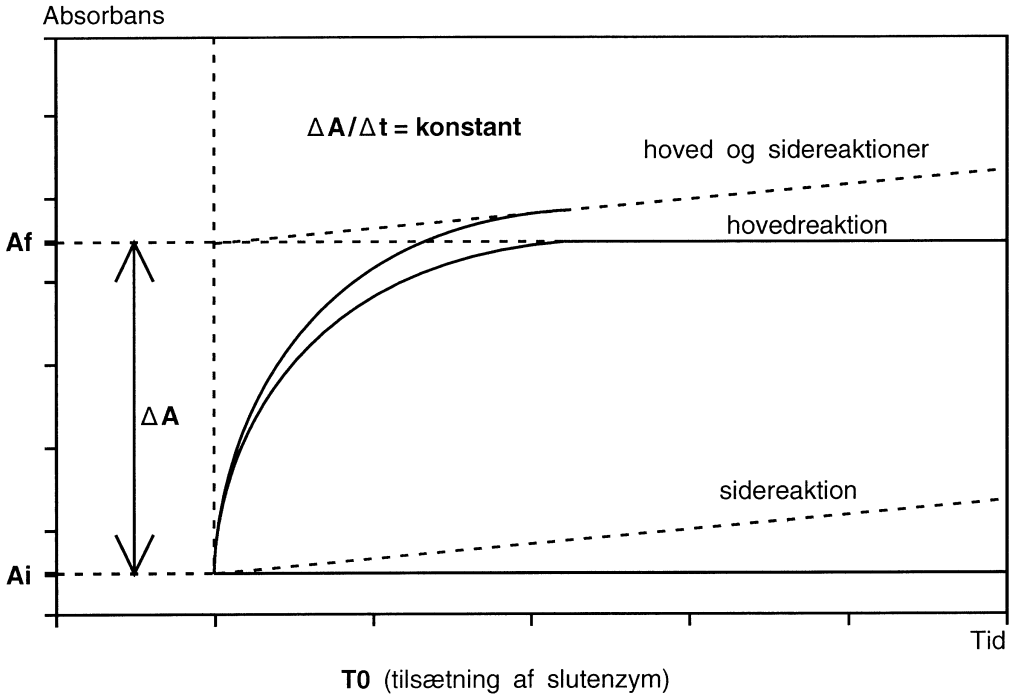
Tillæg A

Behandling af sidereaktioner

Sidereaktioner skyldes som regel sekundære enzymreaktioner, andre enzymer i prøvematricen eller interaktion mellem et eller flere stoffer i matricen og en cofaktor for enzymreaktionen.

Normalt når absorbansen en konstant værdi efter et vist tidsrum, som regel 10-20 min., afhængigt af den specifikke enzymatiske reaktions hastighed. Når der finder sidereaktioner sted, forbliver absorbansen imidlertid ikke på en konstant værdi, men vokser jævnt med tiden; denne type proces kaldes ofte »sidereaktion«.

Når dette fænomen optræder, måles opløsningens absorbans med regelmæssige mellemrum (2-5 minutter), efter at referenceopløsningen har nået sin slutabsorbans. Når absorbansen stiger regelmæssigt, foretages 5-6 målinger, så man ved hjælp af en graf eller ved beregning kan ekstrapolere sig til opløsningens absorbans på det tidspunkt, hvor det endelige enzym blev tilsat (T0). Den ekstrapolerede absorbansforskel på dette tidspunkt (Af – Ai) benyttes til beregning af substratkoncentrationen.



Figur 1 — Sidereaktion

Tillæg B

Statistiske resultater af interkalibrering

År for interkalibrering: 1995
Antal laboratorier: 8
Antal prøver: 5 med tilsætning af D-æblesyre

Prøve	A	B	C	D	E
Antal laboratorier efter eliminering af laboratorier med afvigende resultater	7	8	7	8	7
Antal laboratorier med afvigende resultater	1	—	1	—	1
Antal accepterede resultater	35	41	35	41	36
Gennemsnit ($\bar{\chi}$) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Standardafvigelse for repeterbarhed (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Repeterbarhedsgrænse (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Standardafvigelse for reproducerbarhed (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Reproducerbarhedsgrænse (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Prøvetyper:
A: rødvin; B: rødvin; C: hvidvin; D: hvidvin; E: hvidvin.«

BILAG II

»38. **CYANIDER**

(*NB*: Sikkerhedsforskrifterne for håndtering af kemiske produkter for så vidt angår kloramin T, pyridin, kaliumcyanid, saltsyre og phosphorsyre iagttages. Brugte reagenser bortskaffes efter gældende miljøregler. Pas på den cyanbrinte, der udvikles ved destillation af vin, der er gjort sur.)

1. PRINCIP

Den samlede mængde hydrogencyanid (blåsyre) frigøres ved sur hydrolyse og separeres ved destillation. Efter reaktion med kloramin T og pyridin bestemmes det dannede glutacondialdehyd ved kolorimetri på basis af den blåfarvning, som det giver med 1,3-dimethylbarbitursyre.

2. APPARATUR

2.1. **Destillationsapparat**

Anvend det destillationsapparat, der er beskrevet til bestemmelse af vins alkoholindhold udtrykt i volumen.

2.2. En 500 ml rundbundet kolbe med standardslib

2.3. Termostatstyret vandbad ved 20 °C

2.4. Spektrofotometer med mulighed for absorbansmålinger ved en bølgelængde på 590 nm

2.5. Glaskuvetter eller engangskuvetter med en lysvej på 20 mm.

3. REAGENSER

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

3.2. Opløsning af kloramin T ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$) 3 % (m/v)

3.3. Opløsning af 1,3-dimethylbarbitursyre: 3,658 g 1,3-dimethylbarbitursyre ($C_6H_8N_2O_3$) opløses i 15 ml pyridin og 3 ml saltsyre (ρ_{20} = 1,19 g/ml), og der fyldes op til 50 ml med destilleret vand

3.4. Kaliumcyanid (KCN)

3.5. Opløsning af kaliumiodid (KI), 10 % (m/v)

3.6. Opløsning af sølvnitrat ($AgNO_3$), 0,1 M.

4. FREMGANGSMÅDE

4.1. **Destillation**

I en 500 ml rundbundet kolbe (2.2) anbringes 25 ml vin, 50 ml destilleret vand, 1 ml fosforsyre (3.1) og nogle glasperler. Kolben anbringes straks i destillationsapparatet. Destillatet overføres via et tyndt rør til en 50 ml målekolbe indeholdende 10 ml vand. Målekolben er anbragt i isvand. Der opsamles 30-35 ml destillat (svarende til en samlet mængde væske i målekolben på ca. 45 ml).

Det tynde rør i svaleren skylles med nogle ml destilleret vand, og når destillatets temperatur er 20 °C, fyldes der op til mærket med destilleret vand.

4.2. **Måling**

Anbring 25 ml destillat i en 50 ml konisk kolbe med slibprop, tilsæt 1 ml kloramin T-opløsning (3.2), og luk kolben. Tilsæt efter nøjagtig 60 sekunder 3 ml 1,3-dimethylbarbitursyreopløsning (3.3), luk igen omhyggeligt, og lad kolben henstå i 10 minutter. Mål derefter absorbansen i forhold til en blindprøve (25 ml destilleret vand i stedet for 25 ml destillat) ved en bølgelængde på 590 nm i kuvetter med en lysvej på 20 mm.

5. FASTLÆGGELSE AF KALIBRERINGSKURVEN

5.1. **Titrering af kaliumcyanid med sølvnitrat**

Afvej nøjagtigt ca. 0,2 g KCN (3.4) i en 300 ml målekolbe, og opløs det i 100 ml destilleret vand. Tilsæt 0,2 ml kaliumiodid (3.5) og titrer med 0,1 M sølvnitrat (3.6), indtil der opnås en blivende gulfarvning.

Beregn titeren ud fra, at 1 ml 0,1 M sølvnitratopløsning svarer til 13,2 mg KCN.

5.2. **Kalibreringskurve**

5.2.1. *Fremstilling af kalibreringsopløsninger*

Med kendskab til den under 5.1 bestemte titer fremstilles en kalibreringsopløsning indeholdende 30 mg hydrogencyanid pr. l (30 mg HCN ≙ 72,3 mg KCN). Fortynd denne opløsning i forholdet 1 : 10.

Anbring henholdsvis 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 5,0 ml fortyndet kalibreringsopløsning i hver sin 100 ml målekolbe, og fyld op til mærket med destilleret vand. Disse opløsninger indeholder henholdsvis 30, 60, 90, 120 og 150 µg hydrogencyanid pr. liter.

5.2.2. *Bestemmelse*

Udtag 25 ml af de således fremstillede opløsninger og fortsæt som beskrevet under 4.1 og 4.2.

Kalibreringsopløsningernes absorbansværdier afbildet mod indholdet af hydrogencyanid danner en ret linje gennem nulpunktet.

6. ANGIVELSE AF RESULTATER

Hydrogencyanidindholdet udtrykkes i mikrogram pr. liter (µg/l) uden decimaler.

6.1. **Beregning**

Indholdet af hydrogencyanid aflæses på kalibreringskurven. Er der foretaget en fortynding, multipliceres resultatet med fortyndingsfaktoren.

Repeterbarhed (r) og reproducerbarhed (R)

Hvidvin: $r = 3{,}1$ µg/l eller ca. 6 % · x_i

$R = 12$ µg/l eller ca. 25 % · x_i

Rødvin: $r = 6{,}4$ µg/l eller ca. 8 % · x_i

$R = 23$ µg/l eller ca. 29 % · x_i

hvor

x_i = gennemsnitskoncentration af HCN i vinen.

$x_i = 48{,}4$ µg/l for hvidvin

$x_i = 80{,}5$ µg/l for rødvin.«

BILAG III

44. BESTEMMELSE AF ETHYLCARBAMAT I VIN — SELEKTIV PÅVISNING VED GASKROMATOGRAFI/MASSESPEKTROMETRI

(kan benyttes til bestemmelse af ethylcarbamat i koncentrationer på 10-200 µg/l)

(*NB*: Sikkerhedsforskrifterne for håndtering af kemiske produkter for så vidt angår ethanol, acetone og de kræftfremkaldende stoffer ethylcarbamat og dichlormethan iagttages. Brugte opløsningsmidler bortskaffes efter gældende miljøregler.)

A. Metodens princip

Til prøven tilsættes der propylcarbamat som intern standard, hvorefter prøven fortyndes med vand og sættes på en 50 ml fastfaseekstraktionskolonne. Ethylcarbamat og propylcarbamat elueres med dichlormethan.

Eluatet koncentreres i rotationsfordamper under vakuum. Koncentratet analyseres ved gaskromatografi med detektion ved massespektrometri med SIM-fragmentanalyse (Selected Ions Monitoring).

B. Apparatur og eksempel på kromatograferingsbetingelser

a) Gaskromatograf/massespektrometer (GC/MS) samt eventuelt prøvefilter og databehandlingssystem eller tilsvarende.

Kapillarkolonne af graft silica 30 m (*) x 0,25 mm Ø (indre), 0,25 µm film af Carbowax 20M-typen

Kørselsbetingelser: Injektor 180 °C, heliumbæregasflow 1 ml/min. ved 25 °C, injektion ved »splitless/split«-metoden.

Temperaturprogram: 40 °C i 45 sek., derefter stigende med 10°/min. indtil 60 °C, derefter med 3°/min. indtil 150 °C (**), derefter opvarmning til 220 °C, som fastholdes i 4 min. 15 sek. Den specifikke retentionstid er for ethylcarbamat 23-27 min., for propylcarbamat 27-31 min.

Interface mellem gaskromatograf og massespektrometer: overførselsrør med temperatur 220 °C. Massespektrometerets parametre indstilles manuelt med perfluortributylamin og optimeres til laveste massefølsomhed, SIM-dataopsamling, »solvent delay« og dataopsamling startes efter 22 min. tidskonstant pr. ion 100 ms.

b) Vakuumrotationsfordamper eller opkoncentreringssystem svarende til Kuderna Danish

(*NB*: genfindingen af ethylcarbamat i kontrolprøven (C(g)) skal være 90-110 % for hele processen)

c) Enhalset pærekolbe, 300 ml, med slib

d) Opkoncentreringsglas, 4 ml, med inddelinger, med teflonbelagt hals og prop

C. Reagenser

a) Acetone, LC-kvalitet

NB: Kontroller hvert parti inden brug til GC/MS for manglende udslag for ioner med m/z 62, 74 og 89.

b) Dichlormethan

NB: Kontroller hvert parti inden brug til GC/MS efter 200 ganges opkoncentrering for manglende udslag for ioner med m/z 62, 74 og 89.

c) Ethanol, vandfri

(*) For visse vine med særlig stort indhold kan det være at foretrække at benytte en 50 m lang kapillarkolonne.
(**) For visse vine med særlig stort indhold kan en temperaturprogrammering på 2 °C/min. være at foretrække.

d) Ethylcarbamat (EC), standardopløsninger

1) Stamopløsning 1,00 mg/ml. Afvej 100 mg EC (≥ 99 % rent) i en 100 ml målekolbe, og fyld op med acetone.

2) Standardarbejdsopløsning 10,0 µg/ml. Overfør 1 ml af EC-stamopløsningen til en 100 ml målekolbe, og fyld op til mærket med acetone.

e) Propylcarbamat (PC), standardopløsninger

1) Stamopløsning 1,00 mg/ml. Afvej 100 mg PC (analysekvalitet) i en 100 ml målekolbe, og fyld op med acetone.

2) Standardarbejdsopløsning 10,0 µg/ml. Overfør 1 ml af PC-stamopløsningen til en 100 ml målekolbe, og fyld op til mærket med acetone.

3) Intern standardopløsning 400 ng/ml. Overfør 4 ml af PC-standardarbejdsopløsningen til en 100 ml målekolbe, og fyld op til mærket med vand.

f) Kalibrerede EC- og PC-standardopløsninger

Fortynd EC- og PC-standardarbejdsopløsninger (d, 2) og e, 2)) med dichlormethan til et indhold på

1) 100 ng EC og 400 ng PC pr. ml

2) 200 ng EC og 400 ng PC pr. ml

3) 400 ng EC og 400 ng PC pr. ml

4) 800 ng EC og 400 ng PC pr. ml

5) 1 600 ng EC og 400 ng PC pr. ml.

g) Kontrolprøve, 100 ng EC pr. ml i 40 % ethanol

Overfør 1 ml EC-standardarbejdsopløsning (d, 2)) til en 100 ml målekolbe, og fyld op til mærket med 40 % ethanol.

h) Fastfaseekstraktionskolonne

Færdigpakket engangskolonne med diatoméjord, kapacitet 50 ml

NB: Inden analysen kontrolleres hvert parti ekstraktionskolonner for genfinding af EC og PC og for manglende udslag for ioner med m/z 62, 74 og 89. Fremstil en kontrolprøve med 100 ng EC pr. ml (g). Analyser 5,00 ml af denne prøve som beskrevet i D, a), E og F. En genfinding på 90-110 ng EC pr. ml er tilfredsstillende. Absorbenter med uregelmæssig partikelstørrelse kan give meget langsomt gennemløb, hvilket går ud over genfindingen af EC og PC. Hvis der efter flere forsøg ikke opnås 90-110 % af kontrolprøvens værdi, skiftes kolonnen ud, eller der benyttes en korrigeret kalibreringskurve over genfinding til at bestemme EC kvantitativt. Den korrigerede kalibreringskurve fremkommer ved brug af standardopløsninger som beskrevet i f), idet der benyttes 40 % ethanol i stedet for dichlormethan.

Analyser 1 ml kalibreringsstandardopløsning som beskrevet i D, E og F.

Optegn en ny kalibreringskurve ved hjælp af de ekstraherede standardprøvers EC/PC-forhold.

D. **Fremstilling af analyseprøve**

Anbring følgende mængde prøvemateriale i 2 bægerglas på hver 100 ml:

a) vin med over 14 % vol. alkohol: 5,00 ± 0,01 ml

b) vin med op til 14 % vol. alkohol: 20,00 ± 0,01 ml.

Tilsæt til hvert bægerglas 1 ml PC-opløsning som intern standard og vand til et samlet volumen på 40 ml (eller 40 g).

E. **Ekstraktion**

Foretag ekstraktionen i stinkskab med passende udsugning.

Overfør den under D fremstillede analyseprøve til ekstraktionskolonnen.

Skyl bægerglasset med 10 ml vand, og overfør dette skyllevand til kolonnen.

Lad væsken henstå på kolonnen i 4 minutter. Eluer med 2 x 80 ml dichlormethan. Opsaml eluatet i en 300 ml konisk kolbe.

Inddamp eluatet til 2-3 ml på rotationsfordamper over vandbad ved 30 °C (*NB*: der må ikke inddampes til tørhed).

Overfør den opkoncentrerede rest med en Pasteur-pipette til et 4 ml glas med inddelinger.

Skyl kolben med 1 ml dichlormethan, og overfør skyllevæsken til glasset. Opkoncentrer prøven til 1 ml under en svag nitrogenstrøm.

Overfør eventuelt koncentratet til et glas til GC/MS-analyse.

F. **GC/MS-analyse**

a) Kalibreringskurve

Injicer 1 µl af hver kalibreringsstandardopløsning (C, f)) i GC/MS-apparaturet. Optegn en kurve med EC/PC-arealforholdet for ionen med m/z 62 som ordinat og EC-mængden i ng/ml (dvs. 100, 200, 400, 800 og 1 600 ng/ml) som abscisse.

b) EC-bestemmelse

Injicer 1 µl koncentreret ekstrakt (E) i GC/MS-apparaturet, og beregn EC/PC-arealforholdet for ionen med m/z 62. Find EC-koncentrationen (ng/ml) i ekstraktet ud fra kalibreringskurven for den interne standard. Beregn EC-koncentrationen (ng/ml) i analyseprøven ved at dividere EC-mængden (ng) i ekstraktet med analyseprøvens volumen (ml).

c) Kontrol af EC's renhed

Det iagttages, om udslagene for ionerne med m/z 62, 74 og 89 fremkommer ved EC's retentionstid. Disse udslag svarer til hovedfragmenterne $(M - C_2H_2)^+$, $(M - CH_3)^+$ og molekylarionen (M). Tilstedeværelsen af EC er bekræftet, hvis den relative mængde af disse ioner ikke afviger mere end 20 % fra de tilsvarende tal for EC-standarden. Det kan være nødvendigt at koncentrere ekstrakter yderligere for at få et tilstrækkeligt udslag for ionen med m/z 89.

G. **Ringanalyse**

Tabellen viser enkeltresultaterne fra den praktiske øvelsesprøve og begge vintyper.

Efter en Cochran-test har et resultatpar måttet elimineres, for vin med et alkoholindhold på mere end 14 % vol. og et for vin med et alkoholindhold på op til 14 % vol., fra to forskellige laboratorier.

Den relative reproducerbarhed (RSD_R) har tendens til at aftage med stigende koncentration af ethylcarbamat.

Resultados del método de déterminación del carbamato de etilo CE en las bebidas alcohólicas por CG/EM

Prøve	Gennemsnitligt fundet indhold af EC (ng/ml)	Genfinding af tilsat EC (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Vin med over 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 med op til 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