

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 761/1999

av den 12 april 1999

om ändring av förordning (EEG) nr 2676/90 om fastställande av gemensamma analysmetoder för vin

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning (EEG) nr 822/87 av den 16 mars 1987 om den gemensamma organisationen av marknaden för vin ⁽¹⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 1627/98 ⁽²⁾, särskilt artikel 74 i denna, och av följande skäl:

I bilagan till kommissionens förordning (EEG) nr 2676/90 ⁽³⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 822/97 ⁽⁴⁾, finns en beskrivning av olika analysmetoder. Den metod för analys av D-äppelsyra som anges i kapitel 20 har visat sig vara något oprecis, samtidigt som en ny och mer tillförlitlig metod har tagits fram. Vad gäller analys av cyanidderivat har det också utvecklats en ny metod som är känsligare och lättare att tillämpa än tidigare använda metoder. Likaså har det på internationell nivå tagits fram en ny metod för bestämning av etylkarbamat i vin. Dessa tre metoder har utvärderats i enlighet med internationellt erkända kriterier. Användningen av metoderna kommer att leda till en bättre kontroll av vinets kvalitet och äkthet samt förhindra sådana konflikter som beror på användning av föråldrade och inte helt tillförlitliga analysmetoder. Beskrivningarna av de nya metoderna har godkänts

av Internationella vinkontoret och bör införlivas med förordningen.

De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från Förvaltningskommittén för vin.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilagan till förordning (EEG) nr 2676/90 skall ändras på följande sätt:

- 1) Kapitel 20 (D-äppelsyra) skall ersättas med bilaga I till den här förordningen.
- 2) Kapitel 38 (Cyanidderivat) skall ersättas med bilaga II till den här förordningen.
- 3) Bilaga III till den här förordningen skall läggas till som kapitel 44.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den sjunde dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 12 april 1999.

På kommissionens vägnar

Franz FISCHLER

Ledamot av kommissionen

⁽¹⁾ EGT L 84, 27.3.1987, s. 1.

⁽²⁾ EGT L 210, 28.7.1998, s. 10.

⁽³⁾ EGT L 272, 3.10.1990, s. 1.

⁽⁴⁾ EGT L 117, 7.5.1997, s. 10.

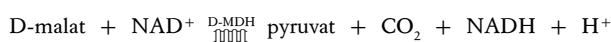
BILAGA I

"20. BESTÄMNING AV D-ÄPPELSYRA

(enzymatisk metod)

1. PRINCIP

I närvaro av D-malat-dehydrogenas (D-MDH) oxideras D-äppelsyra (D-malat) till oxalacetat av nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD). Det bildade oxalacetatet omvandlas till pyruvat och koldioxid:



Bildningen av NADH mäts genom den ökade absorbansen vid våglängderna 334, 340 eller 365 nm, och den bildade mängden NADH är proportionell mot den ursprungliga mängden D-malat.

2. REAGENS

Reagens som räcker till cirka 30 bestämningar säljs i kit bestående av

- Flaska 1 som innehåller omkring 30 ml buffertlösning i form av HEPES (N-(2-hydroxi-etyl)piperazin-N'-2-etansulfonsyra) pH = 9,0 samt stabiliserande ämnen.
- Flaska 2 som innehåller omkring 210 mg lyofiliserat NAD.
- Flaska 3 (tre flaskor) som innehåller lyofiliserat D-MDH motsvarande omkring 8 I.E.

Beredning av lösningarna

- Innehållet i flaska 1 späds ej. Lösningen skall ha en temperatur på 20–25 °C vid användning.
- Lös innehållet i flaska 2 i 4 ml dubbeldestillerat vatten.
- Lös innehållet i en av flaskorna 3 i 0,6 ml dubbeldestillerat vatten. Lösningen skall ha en temperatur på 20–25 °C vid användning.

Lösningarnas stabilitet

Innehållet i flaska 1 kan förvaras åtminstone ett år vid +4 °C. Lösning 2 kan förvaras omkring 3 veckor vid +4 °C och 2 månader vid –20 °C. Lösning 3 kan förvaras i fem dagar vid +4 °C.

3. UTRUSTNING

- Spektrofotometer som är anpassad för mätningar vid 340 nm, d.v.s. absorptionsmaximum för NADH. Om en sådan inte finns kan man använda en fotometer med diskontinuerligt spektrum som kan användas för mätningar vid 334 nm och 365 nm. Vid absoluta absorbansmätningar (i stället för en kalibreringsskala används extinktionskoefficienten för NADH) måste utrustningens våglängds- och absorbansskala kontrolleras.
- Glas- eller engångskyvetter med bredden 1 cm.
- Mikropipetter för volymer på 0,01–2 ml.

4. BEREDNING AV PROVET

Bestämningen av D-malat görs i regel direkt, utan att vinet dessförinnan avfärgats.

Mängden D-malat i kyvetten skall vara mellan 2 och 50 µg. Späd därför vinet till en malatkoncentration på 0,02–0,5 g/l eller 0,02–0,3 g/l (beroende på vilken utrustning som används).

Spädningstabell:

Beräknad mängd D-malat/liter		Spädning med vatten	Utspänningsfaktor (F)
Mätt vid:			
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. UTFÖRANDE

Spektrofotometern ställs in på våglängden 340 nm. Absorbansmätningarna utförs i kyvetter med bredden 1 cm. Absorbansvärdet noll kan antingen ställas in för luft (ingen kyvett skall sitta i) eller för vatten.

I kyvetten hålls följande vätskor:

	Referenslösning	Analyslösning
Lösning 1	1,00 ml	1,00 ml
Lösning 2	0,10 ml	0,10 ml
Dubbeldestillerat vatten	1,80 ml	1,70 ml
Prov	—	0,10 ml

Rör om. Efter ungefär 6 minuter mäts absorbansen för referens- och analyslösningen (A_1).

Tillsätt:

	Referenslösning	Analyslösning
Lösning 3	0,05 ml	0,05 ml

Rör om. Vänta tills reaktionen har ägt rum (omkring 20 minuter) och mät absorbansen för referens- och analyslösningarna (A_2).

Bestäm skillnaden i absorbans ($A_2 - A_1$) mellan referens- (ΔA_T) och analyslösningen (ΔA_E). Subtrahera skillnaden i absorbans för referenslösningen från skillnaden i absorbans för analyslösningen: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Observera: Den tid som enzymreaktionen tar kan variera mellan olika kit; det värde som anges här är bara ungefärligt. Tiden bör därför bestämmas för varje enskilt kit.

D-äppelsyra reagerar snabbt. Enzymet har också L-vinsyra som substrat, men denna reaktion är inte alls lika snabb. Effekterna av denna mindre interferens kan korrigeras genom extrapolering (se tillägg A).

6. BERÄKNING AV RESULTAT

Koncentrationen i milligram per liter beräknas med hjälp av formeln

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

V = Analyslösningens volym i ml (2,95 ml)

v = Provets volym i ml (0,1 ml)

M = molekylvikten av det ämne som skall mätas (för D-äppelsyra: 134,09)

d = kyvettens bredd i cm (1 cm)

ε = absorptionskoefficient för NADH:

vid 340 nm = 6,3 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹)

vid 365 nm = 3,4 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹)

vid 334 nm = 6,18 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹).

Om provet har späts vid beredning skall resultatet multipliceras med utspädningsfaktorn (F).

Koncentrationen D-äppelsyra anges i milligram per liter (mg/l) utan decimaler.

7. NOGGRANNHET

Resultaten från provningsjämförelsen beträffande metodens noggrannhet sammanfattas i tillägg B. Det är möjligt att de värden som erhållits vid provningsjämförelsen inte är relevanta för andra koncentrationer av analyt och matris än de som anges i tillägg B.

7.1 Repeterbarhet

Den absoluta skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförts med kortast möjliga mellanrum av en och samma person på samma laboratorieprov och med samma utrustning skall inte överstiga värdet r i mer än 5 % av fallen.

$$r = 11 \text{ mg/l.}$$

7.2 Reproducerbarhet

Den absoluta skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförts på samma laboratorieprov men i skilda laboratorier skall inte överstiga värdet R i mer än 5 % av fallen.

$$R = 20 \text{ mg/l}$$

8. KOMMENTARER

Med tanke på metodens noggrannhet måste värden för D-äppelsyra som understiger 50 mg/l vid behov kontrolleras med hjälp av en annan analysmetod som bygger på en avvikande mätprincip, till exempel den metod som föreslagits av Przyborski m.fl. (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215–218, 1993).

För att undvika en möjlig inhibering av den enzymatiska aktiviteten orsakad av polyfenoler får mängden vin i kyvetten inte överstiga 0,1 ml.

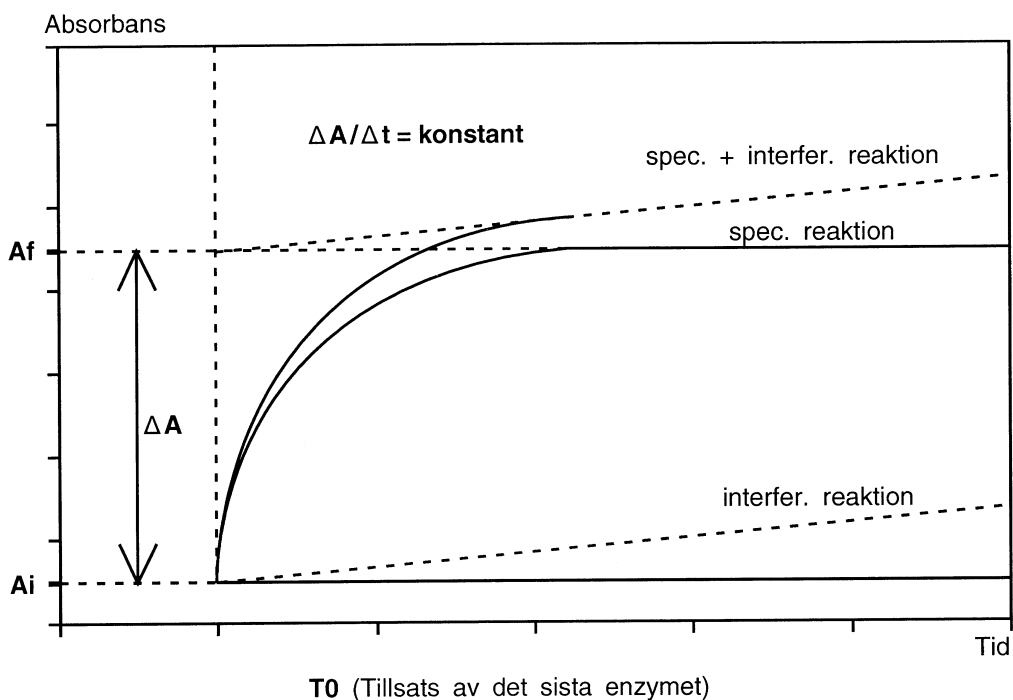
Tillägg A

Beaktande av interfererande reaktioner

Interfererande reaktioner kan ha flera orsaker. I allmänhet beror de antingen på att det enzym som används katalyserar mer än en reaktion, att det finns andra enzymer i provet, eller på att det förekommer interaktioner mellan ett eller flera ämnen i matrisen och en kofaktor för den enzymatiska reaktionen.

Vid en normal enzymatiskt kontrollerad reaktion når absorbsansen ett konstant värde efter en viss tid, vanligen 10–20 min, beroende på hastigheten hos den specifika reaktionen. Om sekundära reaktioner inträffar når dock aldrig absorbsansen ett konstant värde, utan ökar konstant med tiden. Det är detta fenomen som brukar kallas interfererande reaktion.

När detta problem uppstår bör lösningens absorbsans mätas med jämna mellanrum (2–5 min), efter det att kalibreringslösningen nått sin slutliga absorbsans. Om absorbsansen stiger konstant görs 5–6 mätningar, och värdena från dessa används vid en extrapolering (grafisk eller numerisk) för att beräkna vad lösningens absorbsans skulle ha varit när det sista enzymet tillsattes (T_0). Skillnaden i extrapolerad absorbsans vid denna tidpunkt ($A_f - A_i$) används vid beräkningen av substratkoncentrationen.



Figur 1: Interfererande reaktion

Tillägg B

Statistiska resultat från provningsjämförelser

År då provningsjämförelsen gjordes: 1995

Antal laboratorier: 8

Antal prover: 5 med tillsats av D-äppelsyra

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter att laboratorier som uppvisat avvikande resultat tagits bort	7	8	7	8	7
Antal laboratorier som uppvisat avvikande resultat	1	—	1	—	1
Antal godkända resultat	35	41	35	41	36
Genomsnittsvärde (\bar{x}) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Standardavvikelse repeterbarhet (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Relativ standardavvikelse repeterbarhet (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Repeterbarhetsgräns (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Standardavvikelse reproducerbarhet (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Relativ standardavvikelse reproducerbarhet (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Reproducerbarhetsgräns (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Typ av prov:

A: rött vin; B: rött vin; C: vitt vin; D: vitt vin; E: vitt vin.”

BILAGA II

38. CYANIDDERIVAT

(*Observera:* Iaktta säkerhetsföreskrifterna vid hantering av kemiska produkter som kloramin T, pyridin, kaliumcyanid, saltsyra och fosforsyra. Hantera de använda produkterna enligt gällande miljöföreskrifter. Iaktta försiktighet när cyanväte frigörs vid destillation av det surgjorda vinet).

1. PRINCIP

Den totala mängden cyanväte i vinet frigörs genom sur hydrolys och separeras genom destillation. Efter reaktion med kloramin T och pyridin bestäms koncentrationen av den bildade glutakon-dialdehyden kolorimetriskt genom den blåfärgning som ämnet ger tillsammans med 1,3-dimetylbarbitursyra.

2. UTRUSTNING

2.1 Destillationsapparat.

Använd samma apparat som används vid bestämning av alkoholhalt (uttryckt i volymprocent) i vin.

2.2 Rundkolv, 500 ml, normalslipad

2.3 Termostatreglerat vattenbad med temperaturen 20 °C

2.4 Spektrofotometer som är anpassad för absorptionsmätningar vid 590 nm

2.5 Glas- eller engångskvyetter med bredden 20 mm

3. REAGENS

3.1 Fosforsyra (H_3PO_4) 25 % (m/V)3.2 Lösning av kloramin T ($C_7H_7ClNNaO_2S, 3H_2O$) 3 % (m/V)3.3 Lösning av 1,3-dimetylbarbitursyra: lös 3,658 g 1,3-dimetylbarbitursyra ($C_6H_8N_2O_3$) i 15 ml pyridin och 3 ml saltsyra (ρ vid 20 °C = 1,19 g/ml) och fyll till 50 ml med destillerat vatten

3.4 Kaliumcyanid (KCN)

3.5 Lösning av kaliumjodid (KI), 10 % (m/V)

3.6 Lösning av silvernitrat ($AgNO_3$), 0,1 M

4. UTFÖRANDE

4.1 Destillering:

Häll 25 ml vin, 50 ml destillerat vatten, 1 ml fosforsyra (3.1) och några kokstenar i rundkolven (2.2). Sätt omedelbart in kolven i destilleringsapparaten. För över 30–35 ml destillat genom det avsmalnande röret efter kylaren till en 50 ml mätkolv med 10 ml vatten (den totala mängden vätska i mätkolven blir följaktligen cirka 45 ml). Mätkolven skall stå i nollgradigt vatten.

Tvätta det avsmalnande röret med några milliliter destillerat vatten, värm destillatet till 20 °C och fyll på med destillerat vatten till märket.

4.2 Mätning

För över 25 ml av destillatet till en 50 ml E-kolv med slipad propp. Tillsätt 1 ml kloramin T-lösning (3.2) och tillslut hermetiskt. Efter exakt 60 sekunder tillsätts 3 ml 1,3-dimetylbarbitursyra (3.3). Tillslut hermetiskt och låt stå i 10 minuter. Mät sedan absorbansen mot ett referensprov (25 ml destillerat vatten i stället för 25 ml destillat) vid våglängden 590 nm i kvyetter med bredden 20 mm.

5. KALIBRERINGSKURVA

5.1 Titring av kaliumcyanid med silvernitrat

Lös omkring 0,2 g noga uppvägt KCN (3.4) i 100 ml destillerat vatten i en 300 ml mätkolv. Tillsätt 0,2 ml kaliumjodidlösning (3.5) och titrera med 0,1 M silvernitratlösning (3.6) tills en stabil gulaktig färg erhålls.

1 ml silvernitratlösning med koncentrationen 0,1 M motsvarar 13,2 mg KCN. Beräkna utifrån detta KCN-pulvrets halt.

5.2 Kalibreringskurva

5.2.1 Beredning av standardlösningar

Efter att KCN-halten fastställts enligt 5.1 bereds en standardlösning som innehåller 30 mg cyanväte per liter (30 mg HCN \cong 72,3 mg KCN). Späd lösningen 1:10.

Överför 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 och 5,0 ml av den utspädda standardlösningen till 100 ml mätkolvar och späd med destillerat vatten till märket. De färdiga lösningarna innehåller 30, 60, 90, 120 respektive 150 μ g cyanväte per liter.

5.2.2 Mätning

Ta 25 ml av de erhållna lösningarna och fortsätt enligt anvisningarna i 4.1 och 4.2.

Då man i ett diagram avsätter standardlösningarnas absorbans mot cyanvätekoncentrationen erhålls en rät linje som går genom origo.

6. BERÄKNING AV RESULTAT

Cyanvätekoncentrationen uttrycks i mikrogram per liter (μ g/l) utan decimal.

6.1 Beräkning

Läs av cyanvätekoncentrationen med hjälp av kalibreringskurvan. Om provet har späts vid beredning skall resultatet multipliceras med utspädningsfaktorn.

Repetierbarhet (r) och reproducerbarhet (R)

Vitt vin = r = 3,1 μ g/l dvs. ungefär 6 % \cdot x_i

R = 12 μ g/l dvs. ungefär 25 % \cdot x_i

Rött vin = r = 6,4 μ g/l dvs. ungefär 8 % \cdot x_i

R = 23 μ g/l dvs. ungefär 29 % \cdot x_i

x_i = Vinets genomsnittliga HCN-halt

x_i = 48,4 μ g/l för vitt vin

x_i = 80,5 μ g/l för rött vin.”

BILAGA III

44. BESTÄMNING AV ETYLKARBAMAT I VIN – SELEKTIV DETEKTION GENOM GASKROMATOGRAFI/MASSPEKTROMETRI

(För bestämning av etylkarbamat i koncentrationer mellan 10 och 200 µg/l.)

(*Observera:* Iaktta säkerhetsföreskrifterna vid hantering av kemiska produkter som etanol och aceton samt carcinogena ämnen som etylkarbamat och diklormetan. Hantera använda lösningsmedel enligt gällande miljöföreskrifter.)

A. Princip

Propylkarbamat tillsätts provet som en inre standard, lösningen späds med vatten och överförs till en 50 ml SPE-kolonn (*solid phase extraction column*). Etylkarbamat och propylkarbamat elueras med diklormetan.

Eluatet koncentreras i en vakuumrotationsindunstare. Koncentratet separeras med hjälp av gaskromatografi (GC), och detektionen utförs med hjälp av en masspektrometer i *SIM mode (selected ions monitoring)*.

B. Utrustning och kromatografiska förhållanden (exempel)

- (a) Gaskromatograf/masspektrometer (GC/MS) och eventuellt en provväxlare och ett databehandlings-system eller motsvarande.

Kapillärkolonn packad med silica. Längd: 30m (*), inre diameter: 0,25 mm, vätskefilm: 0,25 µm av typen Carbowax 20M.

Inställningar: Injektor 180 °C. Helium som bärgas, 1 ml/minut vid 25 °C. Injektion enligt metoden splitless/split.

Temperaturschema: 40 °C under 45 sekunder, därefter höjning med 10 °C per minut upp till 60 °C, sedan med 3 °C per minut till 150 °C (**). Gå sedan upp till 220 °C och håll denna temperatur i 4 minuter och 15 sekunder. Den specifika retentionstiden är 23–27 minuter för etylkarbamat och 27–31 minuter för propylkarbamat.

Förbindelsen gaskromatograf-spektrometer (GC/MS): överföring vid 220 °C. Parametrarna för masspektrometern ställs in manuellt med perfluortributylamin och optimeras för lägsta möjliga masskänslighet, *SIM mode*, den mobila fasens retentionstid samt tiden för påbörjandet av datainsamlingen: 22 min, mättid/jon: 100 ms.

- (b) Vakuumrotationsindunstare eller koncentrationssystem av typen Kuderna Danish.

(*Observera:* Utbytet för etylkarbamat i testlösningen (C.g) skall vara 90–110 % under processens gång.)

- (c) Pärnformad kolv, 300 ml, med slipad hals.

- (d) Koncentrationsrör – 4 ml, graderat, med teflonbehandlad fog och en propp.

C. Reagens

- (a) Aceton – LC-kvalitet.

Observera: Före GC/MS skall varje parti aceton analyseras; joner med m/z-värden på 62, 74 och 89 skall då inte ge något utslag.

- (b) Diklormetan

Observera: Före GC/MS skall varje parti diklormetan analyseras efter att ha koncentrerats 200 ggr; joner med m/z-värden på 62, 74 och 89 skall då inte ge något utslag.

- (c) Etanol – vattenfri

(*) För viner med särskilt komplext innehåll kan det vara lämpligt att använda en 50 m kapillärkolonn.

(**) För viner med särskilt komplext innehåll kan det vara lämpligt att endast höja temperaturen med 2 °C per minut.

(d) Standardlösningar av etylkarbamat

1. Stamlösning – 1,00 mg/ml. Väg upp 100 mg etylkarbamat (renhetsgrad $\geq 99\%$) i en 100 ml mätkolv och späd med aceton till märket.
2. Spädd lösning – 10,0 $\mu\text{g/ml}$. För över 1 ml etylkarbamat-stamlösning till en 100 ml mätkolv och späd med aceton till märket.

(e) Standardlösningar av propylkarbamat

1. Stamlösning – 1,00 mg/ml. Väg upp 100 mg propylkarbamat (reagenskvalitet) i en 100 ml mätkolv och späd med aceton till märket.
2. Spädd lösning – 10,0 $\mu\text{g/ml}$. För över 1 ml av propylkarbamat-stamlösningen till en 100 ml mätkolv och späd med aceton till märket.
3. Inre standard-lösning av propylkarbamat – 400 ng/ml. För över 4 ml av den spädda lösningen av propylkarbamat till en 100 ml mätkolv och späd med vatten till märket.

(f) Kalibrerade standardlösningar av etylkarbamat och propylkarbamat

Späd de spädda lösningarna av etylkarbamat (d.2) och propylkarbamat (e.2) med diklormetan så att följande koncentrationer erhålls:

1. (100 ng etylkarbamat och 400 ng propylkarbamat) / ml.
2. (200 ng etylkarbamat och 400 ng propylkarbamat) / ml.
3. (400 ng etylkarbamat och 400 ng propylkarbamat) / ml.
4. (800 ng etylkarbamat och 400 ng propylkarbamat) / ml.
5. (1 600 ng etylkarbamat och 400 ng propylkarbamat) / ml.

(g) Testlösning – 100 ng etylkarbamat / ml i 40 % etanol.

För över 1 ml av den spädda lösningen av etylkarbamat (d.2) till en 100 ml mätkolv och späd med 40 % etanol till märket.

(h) Solid phase-extraktionskolonn – 50 ml, av engångstyp, packad med kiselgur.

Observera: Före analysen kontrolleras varje uppsättning extraktionskolonner beträffande utbytet av etylkarbamat och propylkarbamat och frånvaron av utslag för joner med m/z-värdena 62, 74 och 89. Bered testlösningen (g) med koncentrationen 100 ng etylkarbamat/ml. Analysera 5,00 ml av testlösningen enligt D.a, E och F. Det är godtagbart om utbytet av etylkarbamat är 90–110 ng/ml. Absorbansmedel med oregelbunden partikeldiameter kan göra att flödet går mycket långsamt, vilket påverkar utbytet av etylkarbamat och propylkarbamat. Om man efter åtskilliga försök inte erhåller 90–110 % av värdet från testlösningen skall man ändra kolonnen eller använda en korrigerad kalibreringskurva för att bestämma mängden etylkarbamat. För den korrigerade kalibreringskurvan bereds standardlösningarna på det sätt som beskrivs i f men med användning av 40 % etanol i stället för diklormetan.

Analysera 1 ml av standardlösningen för kalibrering enligt beskrivningarna i D, E och F.

Gör en ny kalibreringskurva genom att använda kvoten etylkarbamat/propylkarbamat från de extraerade standardlösningarna.

D. Beredning av analysprov

Överför vinet till 2 separata 100 ml bägare. Följande mängder skall användas:

- (a) För viner som innehåller mer än 14 volymprocent alkohol: $5,00 \pm 0,01$ ml.
- (b) För viner som innehåller maximalt 14 volymprocent alkohol: $20,00 \pm 0,01$ ml.

I varje bägare hälls 1 ml inre standard-lösning med propylkarbamat (C.e.3) samt vatten, så att den totala volymen blir 40 ml (eller vikten 40 g).

E. Extraktion

Utför extraktionen i dragskåp med god ventilation.

För över den beredning som gjordes i D till extraktionskolonnen.

Skölj bägaren med 10 ml vatten och för över sköljvattnet till kolonnen.

Låt vätskan absorberas i kolonnen under 4 minuter. Eluera med 2×80 ml diklormetan. Samla upp eluatet i en 300 ml E-kolv.

Låt vätskan i eluatet evaporera i en vakuumrotationsindunstare med $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ vattenbad tills 2–3 ml återstår (*OBS!* – Evaporatet får inte evaporeras torrt).

För över det koncentrerade evaporatet till ett 4 ml graderat rör med hjälp av en pasteurpipett.

Skölj E-kolven med 1 ml diklormetan och för över sköljvätskan till röret. Koncentrera provet till 1 ml i en svag kvävgasström.

För eventuellt över koncentratet till en annan kolv inför GC/MS-analysen.

F. GC/MS-analys

(a) Kalibreringskurva

Injicera $1\text{ }\mu\text{l}$ av var och en av standardlösningarna (C.f) i GC/MS-instrumentet. Upprätta en kurva genom att på y-axeln avsätta kvoten mellan areorna för jonen med m/z-värdet 62, och på x-axeln mängden etylkarbamat i ng/ml (dvs. 100, 200, 400, 800 och 1600 ng/ml).

(b) Bestämning av etylkarbamat

Injicera $1\text{ }\mu\text{l}$ av det koncentrerade extraktet från E i GC/MS-systemet och beräkna kvoten mellan areorna för etylkarbamat och propylkarbamat för jonen med m/z-värdet 62. Fastställ koncentrationen av etylkarbamat (ng/ml) i extraktet genom att använda kalibreringskurvan för den inre standarden. Beräkna koncentrationen av etylkarbamat i analysprovet (ng/ml) genom att dividera mängden etylkarbamat i extraktet (ng) med volymen av testlösningen (ml).

(c) Bekräftelse av renhetsgraden för etylkarbamat

Fastställ om utslagen för jonerna med m/z-värdena 62, 74 och 89 sammanfaller med retentionstiden för etylkarbamat. Dessa utslag är karaktäristiska för huvudfragmenten $(\text{M}-\text{C}_2\text{H}_2)^+$ och $(\text{M}-\text{CH}_3)^+$ respektive molekyljonen (M). Förekomsten av etylkarbamat bekräftas om de relativa proportionerna av dessa joner inte avviker mer än 20 % från proportionerna i etylkarbamat-standard. Extraktet kan behöva koncentreras på nytt för att man skall få ett tillräckligt utslag för jonen med m/z-värdet 89.

G. Kollaborativ analys

Tabell 1 visar de enskilda resultaten för det praktiska övningsprovet och de två vintyperna.

Som ett resultat av Cochrans test togs ett resultat bort för de viner vars alkoholhalt översteg 14 volymprocent, och ett för de viner vars alkoholhalt var lägre eller lika med 14 volymprocent. Båda dessa kom från olika laboratorier.

Den relativa reproducerbarheten tenderar att minska med ökad koncentration etylkarbamat.

Utvärdering av metoden för bestämning av etylkarbamat i alkoholhaltiga drycker genom GC/MS

Prov	Genomsnittlig koncentration detekterat etylkarbamat (ng/ml)	Utbyte av det etylkarbamat som tillsatts (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Viner över 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
Viner under 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