

**REGLUGERÐ FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR (EB) nr. 761/1999**

frá 12. apríl 1999

**um breytingu á reglugerð (EBE) nr. 2676/90 um að ákveða aðferðir bandalagsins við víngræiningu(\*)**FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA  
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af reglugerð ráðsins (EBE) nr. 822/87 frá 16. mars 1987 um sameiginlega skipulagningu vínmarkaðarins<sup>(1)</sup>, eins og henni var síðast breytt með reglugerð (EB) nr. 1627/98<sup>(2)</sup>, einkum 74. gr.,*og að teknu tilliti til eftirfarandi:*

Í viðauka við reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EBE) nr. 2676/90<sup>(3)</sup>, eins og henni var síðast breytt með reglugerð (EB) nr. 822/97<sup>(4)</sup>, er greiningaraðferðum lýst. Greiningaraðferðin fyrir D-eplasýru, sem lýst er í 20. kafla, hefur reynst óáreiðanleg og ný og nákvæmari aðferð hefur verið þróuð. Þróuð hefur verið ný greiningaraðferð á sýaníðafleiðum sem er næmari og auðveldari í notkun. Á alþjóðavettvangi hefur verið þróuð ný aðferð til að greina etýlkarbamát í víni. Þessar þrjár aðferðir hafa verið löggiltar í samræmi við alþjóðlega viðurkenndar viðmiðanir. Notkun þessara aðferða getur tryggt betra eftirlit með gæðum víns og því að um ósvikna vöru sé að ræða og komið í veg fyrir deilur vegna beitingar úreltra og óáreiðanlegra greiningaraðferða. Al-

þjóðavínskrifstofan hefur samþykkt lýsingar á nýju aðferðunum. Rétt er að fella þær inn í reglugerðina.

Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari reglugerð, eru í samræmi við álit stjórnarnefndar um vín.

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

*1. gr.*

Viðaukanum við reglugerð (EBE) nr. 2676/90 er breytt sem hér segir:

1. Ákvæði I. viðauka við þessa reglugerð komi í stað 20. kafla (D-eplasýra).
2. Ákvæði II. viðauka við þessa reglugerð komi í stað 38. kafla (Sýaníðafleiður).
3. Ákvæði III. viðauka bætist við sem 44. kafli.

*2. gr*Reglugerð þessi öðlast gildi á sjöunda degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópubandalaganna*.

Reglugerð þessi er bindandi í heild sinni og gildir í öllum aðildarríkjunum án frekari lögfestingar.

Gjört í Brussel 12. apríl 1999.

*Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,*

Franz FISCHLER

*framkvæmdastjóri.*

(\*) Þessi EB-gerð, sem birtist í Stjtið. EB L 99, 14.4.1999, bls. 4, var nefnd í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 35/2000 frá 31. mars 2000 um breytingu á bókun 47 við EES-samninginn um afnám tæknilegra hindrana í viðskiptum með vín. Sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópubandalaganna nr. 27, 15.6.2000, bls. 20.

<sup>(1)</sup> Stjtið. EB L 84, 27.3.1987, bls. 1.

<sup>(2)</sup> Stjtið. EB L 210, 28.7.1998, bls. 10.

<sup>(3)</sup> Stjtið. EB L 272, 3.10.1990, bls. 1.

<sup>(4)</sup> Stjtið. EB L 117, 7.5.1997, bls. 10.

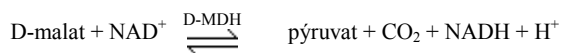
## I. VIÐAUKI

## „20. D-EPLASÝRA

(aðferð með notkun ensíma)

## 1. MEGINREGLA

D-eplasyra (D-malat) er oxuð með níkótínamíðadenínínúkleótíði (NAD) yfir í oxalasetat í viðurvist D-malatvetnisviptis (D-MDH). Oxalasetatið sem myndast er klofið í píruvat og koltvísýring.



NADH-magnið sem myndast, sem mælt er með aukningu gleypni á bylgjulengdinni 334, 340 eða 365 nm, er í hlutfalli við styrk D-malatsins.

## 2. PRÓFUNAREFNI

Kaupa má greiniset með prófunarefnum fyrir u.þ.b. 30 greiningar sem í er eftirfarandi:

- Flaska nr. 1 með u.þ.b. 30 ml af Hepes-jafnalausn [N-(2-hýdroxýletýl)píperasín-N'-2-etansúlfonsýra] pH = 9,0 og stöðgurum.
- Flaska nr. 2 með u.þ.b. 210 mg af frostþurrkuðu NAD.
- Þrjár flöskur nr. 3 með frostþurrkuðu D-MDH, u.þ.b. 8 einingar hver.

**Tilreiðsla lausnanna**

- Innihald flösku nr. 1 er notað óþynnt. Hitastig lausnarinnar er stillt á 20 til 25 °C fyrir notkun.
- Innihald flösku nr. 2 er leyst upp í 4 ml af tvíeimuðu vatni.
- Innihald einnar af flöskunum nr. 3 er leyst upp í 0,6 ml af tvíeimuðu vatni. Hitastig lausnarinnar er stillt á 20 til 25 °C fyrir notkun.

**Stöðugleiki lausna**

Innihald flösku nr. 1 helst stöðugt í að minnsta kosti eitt ár við +4 °C. Lausn nr. 2 helst stöðug í þrjár vikur við +4 °C en í tvo mánuði við -20 °C. Lausn nr. 3 helst stöðug í fimm daga við +4 °C.

## 3. BÚNAÐUR

- Rófljósmaerir sem hægt er að mæla með við 340 nm, þ.e. bylgjulengdina þar sem gleypni NADH er í hámarki. Að öðrum kosti má nota rófljósmaeli með ósamfelldan geislagjafa sem hægt er að mæla með við 334 eða 365 nm. Þar sem um er að ræða algildar gleypnimælingar (þ.e. engar kvörðunarlausnir heldur tilvísun til eðlisgleypni NADH) ber að kanna bylgjulengdarskala og rófagleypni búnaðarins.
- Glerkúvettur með 1 cm breidd sem ljósið fer gegnum (eða einnota kúvettur).
- Örpiplar til að pipla vökvamagni á bilinu 0,01 til 2 ml.

## 4. TILREIÐSLA SÝNISINS

Greining D-malats er yfirleitt framkvæmd beint á víninu, án undangenginnar aflitunar.

Magn D-malats í kúvettunni skal vera á milli 2 og 50  $\mu\text{g}$ . Því verður að þynna vínið til að það gefi af sér D-malatsstyrk sem er milli 0,02 og 0,5 g/l annars vegar eða 0,02 og 0,3 g/l hins vegar (eftir því hvaða búnaður er notaður).

Tafla yfir þynningu:

Áætlað magn D-malats/litra		Þynnt með vatni	Þynningarstuðull
Mælt við:			
340 eða 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. ADFERÐ

Rófljósmælirinn er stilltur á bylgjulengdina 340 nm og gleypnin er ákvörðuð í 1 cm kúvettunum, annaðhvort með því að nota loft til að stilla gleypni á núll (með enga kúvettu í geislaganginum) eða með því að nota vatn.

Eftirfarandi er píplað í kúvettunum:

	Viðmiðun	Prófun
Lausn nr. 1	1,00 ml	1,00 ml
Lausn nr. 2	0,10 ml	0,10 ml
Tvíeimað vatn	1,80 ml	1,70 ml
Sýni til mælingar	—	0,10 ml

Þessu er blandað saman og eftir u.þ.b. sex mínútur er gleypni viðmiðunar- og prófunarlausna ( $A_1$ ) mæld.

Bætt er í:

	Viðmiðun	Prófun
Lausn nr. 3	0,05 ml	0,05 ml

Þessu er blandað saman og beðið uns efnahvörfum er lokið (u.þ.b. 20 mínútur) og því næst er gleypni viðmiðunar- og prófunarlausna ( $A_2$ ) mæld.

Reiknaður er mismunur á gleypni ( $A_2 - A_1$ ) viðmiðunar- ( $\Delta A_T$ ) og prófunarlausna ( $\Delta A_E$ ). Að lokum er reiknaður mismunurinn á þessum mismun:  $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$ .

*Ath.:* Tíminn sem þarf til að ensímvirgni ljúki getur verið mismunandi langur frá einum hópi til annars. Tíminn, sem gefinn er upp hér að framan, er aðeins til leiðbeiningar og mælt er með því að hann sé ákvarðaður fyrir hvern hóp fyrir sig.

D-eplasýra er fljót að hvarfast. Ensímin umbreyta einnig L-vínsýru, en miklu hægar. Þetta skýrir væg hliðarhvörf sem má leiðrétta með útgiskun (sjá viðbæti A).

## 6. FRAMSETNING NIÐURSTAÐNA

Almenn formúlan til að reikna út styrk í mg/l er:

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

þar sem:

V = rúmmál prófunarlausnarinnar í ml (2,95 ml).

v = rúmmál sýnisins í ml (0,1 ml).

MM = mólmassi efnisins sem á að ákvarða (MM = 134,09 fyrir D-eplasyru)

d = breidd kúvettunnar, sem ljósið fer í gegnum, í cm (1 cm):

$\epsilon$  = gleypnistuðull NADH:

við 340 nm = 6,3 (1 mmól<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

við 365 nm = 3,4 (1 mmól<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

við 334 nm = 6,18 (1 mmól<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Hafi sýnið verið þynnt við tilreiðslu þess eru niðurstöðurnar margfaldaðar með þynningarstuðlinum.

Styrkur D-eplasyrunnar er gefinn upp í milligrömmum á lítra (mg/l) án aukastafa.

## 7. NÁKVÆMNI

Í viðbæti B eru teknar saman upplýsingar um samanburðarrannsókn mismunandi rannsóknarstofa á nákvæmni aðferðarinnar. Vera kann að gildin, sem fást úr rannsókninni, eigi ekki við um önnur styrkbil greiniefna og bakgrunna en þau sem eru í viðbæti B.

### 7.1. Endurtekningarnákvæmni

Tölulegur mismunur tveggja stakra prófniðurstaðna á sama prófunarefni, sem sami aðili fær með sama búnaði með skömму millibili, má ekki vera hærri en endurtekningarnákvæmnisgildið r í meira en 5% tilvika.

r = 11 mg/l.

### 7.2. Samanburðarnákvæmni

Tölulegur mismunur tveggja stakra prófniðurstaðna, sem fengnar eru á sama prófunarefni í tveimur mismunandi rannsóknarstofum, má ekki vera hærri en samanburðarnákvæmnisgildið R í meira en 5% tilvika.

R = 20 mg/l.

## 8. ATHUGASEMDIR

Með tilliti til takmarkaðrar nákvæmni þessarar aðferðar skulu gildi D-eplasyru, sem eru undir 50 mg/l, staðfest, ef nauðsyn ber til, með annari greiningaraðferð sem byggð er á annari meginreglu við mælingar, svo sem aðferð Przyborskis. (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

Vinsýnið í kúvettunni skal ekki vera stærra en 0,1 ml til að koma í veg fyrir að pólýfenól geti hamlað ensímvírkni.

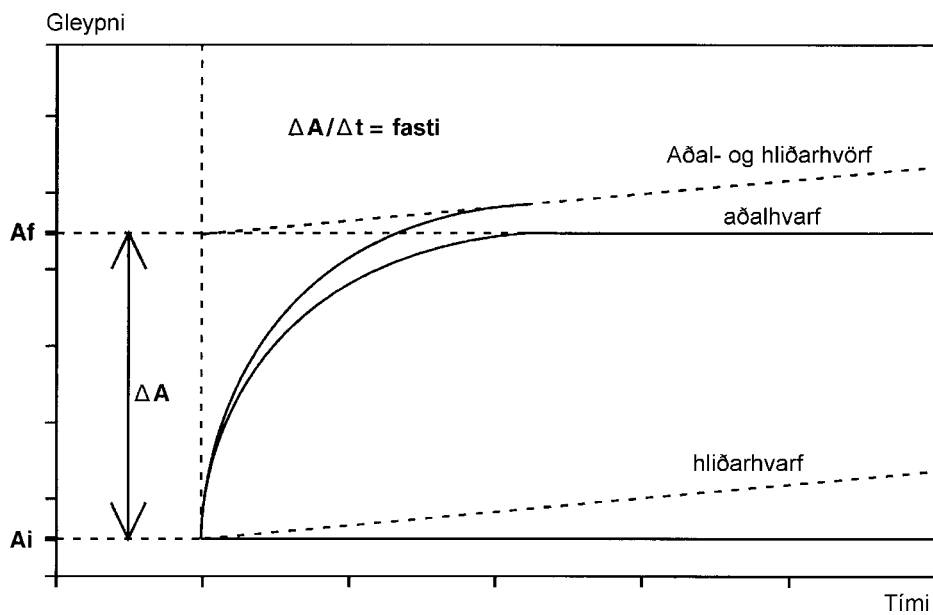
## Viðbætur A

Hvernig ber að bregðast við hliðarhvörfum.

Hliðarhvörf stafa yfirleitt af fylgihvörfum ensíma, viðurvist annarra ensíma í heildarsýninu eða milliverkun eins eða fleiri þátta í heildarsýninu og hjálparþáttar í ensímefnahvörfunum.

Við eðlileg efnahvörf nær gleypni stöðugu gildi eftir tiltekinn tíma, yfirleitt 10 til 20 mínútur, eftir hraða þessara tilteknu ensímefnahvarfa. Þegar fylgihvörf eiga sér stað nær gleypnin hins vegar ekki stöðugu gildi heldur eykst jafnt og þétt. Þetta ferli er almennt kallað „hliðarhvörf“.

Þegar hliðarhvörf eiga sér stað skal mæla gleypni lausnarinnar með reglulegu millibili (á tveggja til fimm mínútna fresti) eftir þann tíma sem þarf til að staðallausn nái lokagleypni. Ef gleypnin eykst jafnt og þétt skulu gerðar fimm til sex mælingar þannig að útgíska megi, með aðstoð línurits eða útreikninga, og ákvarða þannig gleypni lausnarinnar sem hefði fengist þegar lokaensíminu var bætt í (T<sub>0</sub>). Gleypnimismunurinn, sem útgískaður er á þeim tíma (A<sub>f</sub> – A<sub>i</sub>), er notaður til að reikna styrk ensímhvarfefnisins.



T<sub>0</sub> (Lokaensími bætt í)

1. Mynd. Hliðarhvarf

## Viðbætur B

## Tölfræðilegar niðurstöður samanburðarrannsóknar rannsóknastofa

Ár sem samanburðarrannsókn rannsóknastofanna fór fram: 1995  
 Fjöldi rannsóknastofa 8  
 Fjöldi sýna 5, að viðbætti D-eplasyru

Sýni	A	B	C	D	E
Fjöldi rannsóknastofa eftir að rannsóknastofur, sem sýndu afbrigðilegar niðurstöður, höfðu verið útilokaðar	7	8	7	8	7
Fjöldi rannsóknastofa sem sýndu afbrigðilegar niðurstöður	1	—	1	—	1
Fjöldi niðurstaðna sem samþykktar voru	35	41	35	41	36
Meðalgildi ( $\bar{X}$ ) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Staðalfrávik frá endurtekningarnákvæmni ( $s_r$ ) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Hlutfallslegt staðalfrávik frá endurtekningarnákvæmni ( $RSD_r$ ) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Endurtekningarnákvæmnismörk ( $r$ ) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Staðalfrávik frá samanburðarnákvæmni ( $s_R$ ) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Hlutfallslegt staðalfrávik frá samanburðarnákvæmni ( $RSD_R$ ) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Samanburðarnákvæmnismörk ( $R$ ) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Tegundir sýna:

A: rauðvín; B: rauðvín; C: hvítvín; D: hvítvín; E: hvítvín;“

## II. VIÐAUKI

## „38. SÝANÍÐAFLEIÐUR

(Viðvörðun: Fylgja ber öryggisreglum um meðferð iðefna að því er varðar klóramín T, píridín, kalíumsýaníð, saltsýru og fosfórsýru). Farga skal notuðum efnum á viðeigandi hátt í samræmi við gildandi reglur í umhverfismálum. Gæta ber varúðar varðandi blásýru sem myndast við eimun sýrðs víns.

## 1. MEGINREGLA

Heildarmagn óbundinnar blásýru í víninu losnar við vatnsrof sýru og aðskilst við eimun. Eftir efnahvörf við klóramín T og píridín er glútakondíaldehyðið, sem myndast, ákvarðað með litgreiningu á grundvelli bláa litarins sem kemur fram með 1,3-dímetýl-barbitúrsýru.

## 2. BÚNAÐUR

## 2.1. Eimingarbúnaður

Nota skal eimingarbúnaðinn, sem lýst er, til að ákvarða alkóhólinnihald víns

## 2.2. 500 ml kúlufaska með slíp

## 2.3. Vatnsbað með hitastillingu sem er stillt á 20 °C

## 2.4. Rófljósmælir sem mælir gleypni á bylgjulengdinni 590 nm

## 2.5. Glerkúvettur eða einnota kúvettur með 20 mm breidd sem ljósið fer í gegnum

## 3. PRÓFUNAREFNI

3.1. Fosfórsýra (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 25% (m/v)3.2. Klóramín-T-laun (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClNNa O<sub>2</sub>S, 3H<sub>2</sub>O), 3 % (m/v)3.3. 1,3-dímetýl-barbitúrsýrulaun: leyst er upp 3,658 g af 1,3-dímetýlbarbitúrsýru (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) í 15 ml af píridíni og 3 ml af saltsýru (ρ<sub>20</sub> = 1,19 g/ml) og bætt í 50 ml af eimuðu vatni

## 3.4. Kalíumsýaníð (KCN)

## 3.5. Kalíumjodíð (KI), 10% laun (m/v)

3.6. Silfurnítratlaun (AgNO<sub>3</sub>), 0,1 M

## 4. AÐFERÐ

## 4.1. Eimun

25 ml af víni, 50 ml af eimuðu vatni, 1 ml af fosfórsýru (3.1) og nokkrar glerkúlur eru settar í 500 ml flöskuna (2.2). Flaskan er strax sett á eimingarbúnaðinn. Mjó pípa er notuð til að leiða eimaða vökvann inn í kvarðaða 50 ml flösku sem inniheldur 10 ml af vatni. Kvörðuðu flöskunni er stungið í ísvatn. 30 til 35 ml af eimuðum vökva (eða alls u.þ.b. 45 ml af vökva) er safnað í kvörðuðu flöskuna.

Mjóá pípan á svalanum er skoluð með nokkrum millilítrum af eimuðu vatni, hitastig eimaða vökvans er stillt á 20°C og flaskan fyllt með eimuðu vatni upp að markinu.

## 4.2. Mæling

25 ml af eimuðum vökva eru settir í 50 ml keiluflösku með slípuðum glertappa, bætt er í 1 ml af klóramín-T-laun (3.2) og flöskunni lokað með tappanum. Eftir nákvæmlega 60 sekúndur er bætt í 3 ml af 1,3-dímetýl-barbitúrsýrulaun (3.3), lokað með tappanum og látið standa í 10 mínútur. Því næst er gleypnin mæld út frá viðmiðun (25 ml af eimuðu vatni í stað 25 ml af eimuðum vökva) á bylgjulengdinni 590 nm í kúvettum, 20 mm að breidd.

## 5. ÁKVÖRÐUN KVÖRÐUNARFERILSINS

### 5.1. Títrun kalíumsýaníðs með silfurnítrati

Mæld eru nákvæmlega u.þ.b. 0,2 g KCN (3.4) og leyst upp í 100 ml af eimuðu vatni í 300 ml kvarðaðri flösku. Bætt er í 0,2 ml af kalíumjodíðlausn (3.5) og títrað með 0,1 M silfurnítratlausninni (3.6) uns stöðugur, gulleitur litur kemur fram.

Styrkur KCN-sýnisins er reiknaður á þeim forsendum að 1 ml af 0,1 M silfurnítratlausn svari til 13,2 mg af KCN.

### 5.2. Staðalferill

#### 5.2.1. Tilreiðsla staðallausna

Þegar styrkur KCN hefur verið ákvarðaður með aðferðinni sem mælt er fyrir um í lið 5.1 er útbúin staðallausn sem inniheldur 30 mg/l af blásýru (30 mg HCN  $\cong$  72,3 mg KCN). Lausnin er þynnt í hlutföllunum 1:10.

Settir eru 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml og 5,0 ml af þynntu sýnislausninni í 100 ml kvarðaðar flöskur og þær fylltar með eimuðu vatni upp að markinu. Þessar lausnir innihalda hver um sig 30  $\mu$ g, 60  $\mu$ g, 90  $\mu$ g, 120  $\mu$ g og 150  $\mu$ g af blásýru á lítra.

#### 5.2.2. Títrun

Tekin eru 25 ml sýni af lausnunum og haldið áfram eins og getið er hér að framan í liðum 4.1 og 4.2.

Gildin fyrir gleypni staðallausnanna, ásamt viðkomandi blásýrumagni, skulu mynda beina línu í gegnum upphafspunktinn.

## 6. FRAMSETNING NIÐURSTAÐNA

Blásýruinnihaldið er gefið upp í mikrógrömmum á lítra ( $\mu$ g/l) án aukastafa.

### 6.1. Útreikningsaðferð

Blásýrumagnið er lesið af kvörðunarferlinum. Ef sýnið var þynnt eru niðurstöðurnar margfaldaðar með þynningarstuðlinum.

*Endurtekningarnákvæmni (r) og samanburðarnákvæmni (R)*

Hvítvín      = r = 3,1  $\mu$ g/l eða u.þ.b. 6%  $\cdot$   $x_i$

                  R = 12  $\mu$ g/l eða u.þ.b. 25%  $\cdot$   $x_i$

Rauðvín      = r = 6,4  $\mu$ g/l eða u.þ.b. 8%  $\cdot$   $x_i$

                  R = 23  $\mu$ g/l eða u.þ.b. 29%  $\cdot$   $x_i$

$x_i$  = meðalstyrkur HCN í víninu

$x_i$  = 48,4  $\mu$ g/l í hvítvíni

$x_i$  = 80,5  $\mu$ g/l í rauðvíni.“



## III. VIÐAUKI

**44. ÁKVÖRDUN ETÝLKARBAMATS Í VÍNI: SÉRTÆK GREININGARAFERÐ ÞAR SEM NOTUÐ ER GASSKILJUN/MASSAGREINING**

(Má nota til að ákvarða etýlkarbamát með styrknum 10 til 200 µg/l)

(Viðvörðun: Fylgja ber öryggisreglum við meðferð iðefna að því er varðar etanól, asetón og krabbameinsvaldandi efni (etýlkarbamát og díklórmetan). Farga skal notuðum efnum á viðeigandi hátt í samræmi við gildandi reglur í umhverfismálum).

**A. Meginregla**

Própýlkarbamati er bætt í sýnið sem innri staðall, lausnin er þynnt með vatni og komið fyrir á súlskilju. Etýlkarbamatið og própýlkarbamatið eru skoluð út með díklórmetani.

Skolið er styrkt í hverfieiði. Þykknið er greint í gasskilju (GC). Notaður er massagreininemi með SIM-stillingu (Selected Ion Monitoring).

**B. Búnaður og skilyrði við skiljun (dæmi)**

- a) GC/MS-tæki (gasskilja/massagreininir) og, ef nauðsyn ber til, sýnasía og gagnavinnsluferfi eða jafngildi þess.

Hárpípusúla með sintaðri kísl, 30 m (\*) × 0,25 mm að innanmáli, 0,25 µm Carbowax 20M-himna.

Framkvæmd: inntak er stillt á 180 °C, ferðafasi: helíum, 1 ml/mínútu við 25 °C, bein innsprautun (splitless/split method).

Hitastýring: 40 °C í 0,75 mínútur, eftir það er hækkað um 10 °C/mínútu upp að 60 °C, því næst um 3 °C/mínútu að 150 °C (\*\*), hækkað í 220 °C og því hitastigi haldið í 4,25 mínútur. Sérstakur rástími etýlkarbamats er 23 til 27 mínútur en fyrir própýlkarbamát 27 til 31 mínúta.

Tengibúnaður milli gasskilju- og massagreinishluta tækisins (GC/MS): flutningsrör með hitastigið 220 °C. Færibreytur massagreinisins eru handstilltar með perflúrtribútýlamíni og næmnin hámrökuð fyrir lægsta massa, SIM-nemi stilltur á móttöku, leysistöf og upphafstími móttöku 22 mínútur, sviftími/jón 100 ms.

- b) Hverfieiðir eða annað tæki til styrkingar á lausnum, t.d. Kuderna Danish.

(Ath.: Endurheimt etýlkarbamats úr prófunarsýninu, C(g) skal vera milli 90 og 110% í greiningarferlinu.)

- c) Einhálsa perúflaska, 300 ml

- d) Mæliglas fyrir þykkni — 4 ml, kvarðað, með teflonhúðuðum hálsi og tappa

**C. Prófunarefni**

- a) Asetón – LC-gæði

(Ath.: kanna ber fyrir hvern hóp hvort svörun vanti gagnvart jónum með 62, 74 og 89 m/z áður en hann er notaður í GC/MS-tækið.)

- b) Díklórmetan

(Ath.: kanna ber fyrir hvern hóp hvort svörun vanti gagnvart jónum með 62, 74 og 89 m/z áður en hann er notaður í GC/MS-tækinu eftir að hafa verið styrktur 200 sinnum.)

- c) Etanól — vatnsfrítt

(\*) Fyrir tiltekin sérstaklega höfug vín kann að vera ákjósanlegra að nota 50 m hárpípusúlu.

(\*\*) Fyrir tiltekin sérstaklega höfug vín kann að vera ákjósanlegra að nota hitastýringu sem miðast við 2 °C/mínútu.

- d) Etýlkarbamat (EC), staðallausnir
1. Stofnlausn — 1,00 mg/ml. Vegin eru 100 mg af EC (hreinleiki  $\geq 99\%$ ) og sett í 100 ml mæliflösku og þynnt með asetoni.
  2. Staðalvinnulausn — 10,0  $\mu\text{g/ml}$ . Settur er 1 ml af EC-stofnlausninni í 100 ml mæliflösku og þynnt með asetoni upp að markinu.
- e) Própýlkarbamat (PC), staðallausnir
1. Stofnlausn — 1,00 mg/ml. Vegin eru 100 mg af PC og sett í 100 ml mæliflösku og þynnt með asetoni upp að markinu.
  2. Staðalvinnulausn — 10,0  $\mu\text{g/ml}$ . Settur er 1 ml af PC-stofnlausninni í 100 ml mæliflösku og þynnt með asetoni upp að markinu.
  3. Innri PC-staðallausn - 400 ng/ml. Settir eru 4 ml af PC-staðalvinnulausninni í 100 ml mæliflösku og þynnt með vatni upp að markinu.
- f) EC og PC-staðalkvörðunarlausnir
- Þynna ber EC-staðalvinnulausn (2. tölul. d-liðar) og PC-staðalvinnulausn (2. tölul. e-liðar) með díklórmetani þannig að út komi:
1. (100 ng af EC og 400 ng af PC)/ml
  2. (200 ng af EC og 400 ng af PC)/ml
  3. (400 ng af EC og 400 ng af PC)/ml
  4. (800 ng af EC og 400 ng af PC)/ml
  5. (1 600 ng af EC og 400 ng af PC)/ml
- g) Prófunarsýni — 100 ng af EC/ml í 40% etanóli
- Settur er 1 ml af EC-staðalvinnulausninni (2. tölul. d-liðar) í 100 ml mæliflösku og þynntur með 40% etanóli upp að markinu.

- h) Súluskilja — einnota súla pökkuð með kísilgúr, rúmtak 50 ml

*Ath.:* Fyrir greiningu er hver hópur útdráttarsúlna athugaður með tilliti til endurheimtar EC og PC og vöntunar á svörun gagnvart jónum með 62,74 og 89 m/z. Prófunarsýni (g) með 100 ng EC/ml er útbúið. Greindir eru 5,00 ml af prófunarsýninu eins og lýst er í a-lið D-liðar og í E- og F-lið. Endurheimt á 90 til 110 ng af EC/ml telst viðunandi. Íseyg efni með óreglulegt kornþvermál geta leitt til hægs flæðis sem hefur áhrif á endurheimt EC og PC. Ef ekki nást 90 til 110% af gildi prófunarsýnisins eftir nokkrar prófanir skal skipta um súlu eða nota leiðréttan kvörðunarferil fyrir endurheimt til að finna magn EC. Fá má leiðréttan kvörðunarferil með því að útbúa staðallausnir, eins og lýst er í f-lið, með því að nota 40% etanól í stað díklórmetans.

Greindur er 1 ml af staðalkvörðunarlausninni eins og lýst er í D-, E- og F-lið.

Nýr kvörðunarferill er útbúinn með því að nota hlutfall EC og PC í útdregnu staðallausnunum.

#### D. Tilreiðsla prófunarsýna

Eftirtalið magn prófunarefnis er sett í tvö aðskilin 100 ml bikarglós:

- a) vín með alkóhólinnihaldi sem nemur meira en 14% af rúmmáli: 5,00  $\pm$  0,01 ml
- b) vín með alkóhólinnihaldi sem nemur í mesta lagi 14% af rúmmáli: 20,00  $\pm$  0,01 ml

Í hvort bikarglas er settur 1 ml af PC-innri staðallausn (3. tölul. e-liðar í C-lið) og vatn uns náð er heildarrúmmáli sem nemur 40 ml (eða 40 g).

#### E. Útdráttur

Útdrátt skal framkvæma í dragskápi með nauðsynlegri loftræstingu.

Færið sýnið, sem útbúið var samkvæmt D-lið, yfir á útdráttarsúluna.

Skolið bikarglasið með 10 ml af vatni og færið skolvatnið yfir í súluna.

Vökvinn er látinn standa í fjórar mínútur meðan gleypni á sér stað. Skolað er út með 2 x 80 ml af díklórmetani. Skolinu er safnað saman í 300 ml keiluflošku.

Skolið er látið gufa upp, uns eftir eru 2 til 3 ml, í hverfíeimi yfir vatnsbaði við 30°C. (*Ath.*: þetta má ekki sjóða þangað til það þornar).

Þykknið, sem eftir verður, er fært yfir í 4 ml mæliglas með Pasteur-pípli.

Flaskan er skoluð með 1 ml af díklórmetani og skolvökvinn færður yfir í tilraunaglasíð. Sýnið er styrkt í 1 ml við vægt köfnunarefnisstreymi.

Ef nauðsyn ber til er þykknið fært yfir í sýnatökuflošku fyrir greiningu í GC/MS-tækinu.

#### F. Greining í GC/MS-tæki

##### a) Kvörðunarferill

Sprautað er 1 µl af hvorri staðalkvörðunarlausn (f-liður C-liðar) inn í GC/MS-tækið. Teiknað er línurit þar sem EC-PC-flatarmálshlutfallið fyrir 62 m/z jónasvörðun er á lóðréttu ásnúnum og magn EC í ng/ml á lárétta ásnúnum (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml).

##### b) EC-magnmæling

Sprautað er 1 µl af útdregnu þykkni, sem útbúið er samkvæmt E-lið, inn í GC/MS-tækið og EC-PC flatarmálshlutfallið fyrir 62 m/z jónasvörðun reiknað. Fundinn er styrkur EC (ng/ml) í útdrættinum með því að nota innri staðalkvörðunarferil. EC-styrkurinn í prófunarsýninu (ng/ml) er reiknaður með því að deila í EC-magnið (ng) í útdrættinum með rúmmáli prófunarsýnisins (ml).

##### c) Staðfesting á svörðun við EC

Ákvarðað er hvort um svörðun við 62, 74 og 89 m/z jóna er að ræða á rástíma EC. Þessi svörðun svarar til helstu brotanna,  $(M - C_2H_2)^+$  og  $(M - CH_3)^+$  og sameindajónarinnar  $(M)^+$ . Staðfest er að EC sé fyrir hendi ef hlutfallslegt magn þessara jóna vikur ekki meira en 20% frá samsvarandi hlutföllum fyrir EC-staðalinn. Nauðsynlegt kann að vera að þykkja útdrættinn enn frekar til að fá nægilega svörðun varðandi 89 m/z jón.

#### G. Samanburðargreining

Í töflunni koma fram stakar niðurstöður úr verklega prófunarsýninu og fyrir báðar tegundir víns.

Cochran-prófunin leiddi til þess að aðeins eitt par niðurstaðna var felld brott, fyrir vín með yfir 14% alkóhólstyrk og vín með 14% alkóhólstyrk eða minna, frá tveimur rannsóknastofum.

Hlutfallslegri samanburðarnákvæmni ( $RSD_R$ ) hættir til að fara minnkandi eftir því sem styrkur etýlkarbamats eykst.

##### Niðurstöður aðferðar við að ákvarða etýlkarbamát (EC) í áfengum drykkjum með GC/MS-greiningu

Sýni	Meðalmagn af EC sem fannst (ng/ml)	Endurheimt íbættis EC (%)	$S_r$	$S_R$	$RSD_r$ (%)	$RSD_R$ (%)
Vín > 14% miðað við rúmmál	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
Vín = 14% miðað við rúmmál	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