

REGLAMENTO (CE) N° 761/1999 DE LA COMISIÓN

de 12 de abril de 1999

que modifica el Reglamento (CEE) n° 2676/90 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CEE) n° 822/87 del Consejo, de 16 de marzo de 1987, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 1627/98 ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 74,

Considerando que el Reglamento (CEE) n° 2676/90 de la Comisión ⁽³⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 822/97 ⁽⁴⁾, describe métodos de análisis en su anexo; que el método de análisis del ácido D-málico descrito en el capítulo 20 ha resultado ser poco preciso y que se ha desarrollado un nuevo método más exacto; que se ha desarrollado un nuevo método de análisis de los cianoderivados más sensible y de aplicación más sencilla; que se ha desarrollado a escala internacional un nuevo método de determinación del carbamato de etilo en el vino; que estos tres métodos nuevos han sido validados con arreglo a criterios reconocidos internacionalmente; que la aplicación de estos métodos puede garantizar un control más adecuado de la calidad y autenticidad del vino y evitar los litigios que ocasiona la aplicación de métodos de análisis antiguos y poco fiables; que la descripción de estos nuevos métodos ha sido aprobada

por la Oficina internacional de la viña y el vino; que conviene incorporarlos al Reglamento en cuestión;

Considerando que las disposiciones del presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión del vino,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo del Reglamento (CEE) n° 2676/90 se modificará como sigue:

- 1) El capítulo 20 relativo al ácido D-málico se sustituirá por el anexo I del presente Reglamento.
- 2) El capítulo 38 relativo a los cianoderivados se sustituirá por el anexo II del presente Reglamento.
- 3) Se añadirá el capítulo 44 que figura en el anexo III del presente Reglamento.

*Artículo 2*El presente Reglamento entrará en vigor el séptimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 12 de abril de 1999.

Por la Comisión

Franz FISCHLER

Miembro de la Comisión⁽¹⁾ DO L 84 de 27.3.1987, p. 1.⁽²⁾ DO L 210 de 28.7.1998, p. 10.⁽³⁾ DO L 272 de 3.10.1990, p. 1.⁽⁴⁾ DO L 117 de 7.5.1997, p. 10.

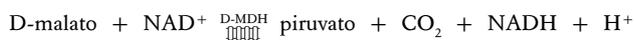
ANEXO I

«20. ÁCIDO D-MÁLICO

DETERMINACIÓN POR MÉTODO ENZIMÁTICO

1. PRINCIPIO

En presencia de D-malato-deshidrogenasa (D-MDH), el ácido D-málico (D-malato) se oxida a oxalacetato por la nicotinamida-adenín-dinucleótido (NAD). El oxalacetato formado se transforma en piruvato y dióxido de carbono.



La formación de NADH, medida por el aumento de la absorbancia a la longitud de onda de 334, 340 o 365 nm, es proporcional a la cantidad de D-malato presente.

2. REACTIVOS

En el comercio se presentan reactivos para unas 30 determinaciones en estuches que contienen:

- a) frasco 1 de unos 30 ml de solución tampon Hepes con ácido [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico] pH = 9,0 y estabilizadores;
- b) frasco 2 de unos 210 mg de NAD liofilizado;
- c) frasco 3 (en número de tres) de D-MDH liofilizado, para analizar 8 muestras.

Preparación de las soluciones

1. Utilizar el contenido del frasco 1 sin diluir. Llevar la solución a 20-25 °C antes del uso.
2. Disolver el contenido del frasco 2 en 4 ml de agua bidestilada.
3. Disolver el contenido de uno de los frascos 3 en 0,6 ml de agua bidestilada. Llevar la solución a 20-25 °C antes del uso.

Estabilidad de las soluciones

El contenido del frasco 1 se conserva al menos un año a + 4 °C; la solución 2 se conserva alrededor de 3 semanas a + 4 °C y 2 meses a - 20 °C; la solución 3 se conserva 5 días a + 4 °C.

3. MATERIAL

- 3.1. Un espectrofotómetro que permita efectuar medidas a 340 nm (máximo de absorción del NADH). En su defecto, un fotómetro de espectro discontinuo que permita efectuar las medidas a 334 nm y 365 nm. Dado que se trata de medidas absolutas de absorbancia (no hay curva de calibrado, sino referencia al coeficiente de extinción del NADH), las escalas de longitud de onda y las absorbancias del aparato deben ser controladas.
- 3.2. Cubetas de 1 cm de trayecto óptico de vidrio o cubetas de un solo uso.
- 3.3. Micropipetas que permitan tomar volúmenes comprendidos entre 0,01 y 2 ml.

4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La determinación de D-malato se efectúa en general directamente en el vino sin decoloración previa.

Como la cantidad de D-malato en la cubeta debe estar comprendida entre 2 µg y 50 µg, conviene diluir el vino de tal forma que la concentración en malato esté comprendida entre 0,02 y 0,5 g/l o 0,02 y 0,3 g/l (según el equipo empleado).

Cuadro de dilución:

Cantidad estimada de malato/litro		D-Dilución con agua	Factor de dilución
Medida a:			
340 or 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. PROCEDIMIENTO

El espectrofotómetro se ajusta a la longitud de onda de 340 nm, las medidas de absorbancia se hacen en las cubetas de 1 cm de trayecto óptico y el cero de absorbancia se ajusta respecto al aire (sin cubeta en el trayecto óptico) o respecto al agua.

En las cubetas de 1 cm de trayecto óptico, introducir:

	Blanco	Ensayo
Solución 1	1,00 ml	1,00 ml
Solución 2	0,10 ml	0,10 ml
Agua bidestilada	1,80 ml	1,70 ml
Muestra	—	0,10 ml

Mezclar. Tras unos 6 minutos, medir las absorbancias de las soluciones blanco y ensayo (A_1).

Añadir:

	Blanco	Ensayo
Solución 3	0,05 ml	0,05 ml

Mezclar; esperar el final de la reacción (unos 20 minutos) y medir las absorbancias de las soluciones blanco y ensayo (A_2).

Determinar las diferencias de absorbancia ($A_2 - A_1$) del blanco (ΔA_T) y del ensayo (ΔA_E). Deducir la diferencia de absorbancia del blanco de la diferencia de absorbancia del ensayo: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Nota: El tiempo necesario para la acción de las enzimas se da aquí a título indicativo ya que puede variar de un lote a otro. Se recomienda determinarlo para cada lote.

El ácido D-málico reacciona rápidamente. Una actividad complementaria de la enzima transforma también el ácido L-tartárico aunque la velocidad sea mucho menor. Es la razón por la cual hay una ligera reacción parásita que es posible corregir por extrapolación (véase el apéndice A).

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La concentración en miligramos por litro se calcula mediante la fórmula general:

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

V = volumen del ensayo en ml (en este caso, 2,95 ml)

v = volumen de la muestra en ml (en este caso, 0,1 ml)

PM = masa molecular de la substancia estudiada (en este caso, ácido D-málico = 134,09)

d = trayecto óptico de la cubeta en cm (en este caso, 1 cm)

ε = coeficiente de absorción molar del NADH:

a 340 nm = 6,3 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹)

a 365 nm = 3,4 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹)

a 334 nm = 6,18 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹).

Si se ha efectuado una dilución durante la preparación de la muestra, multiplicar el resultado por el factor de dilución.

La concentración en ácido D-málico se da en miligramos por litro (mg/l) sin decimales.

7. FIDELIDAD

Los detalles relativos a la prueba interlaboratorios en lo que atañe a la fidelidad del método se resumen en el apéndice B. Los valores derivados de la prueba interlaboratorios pueden no ser aplicables a gamas de concentración del analito y a matrices diferentes de las que se dan en el apéndice B.

7.1. LIMITE DE REPETIBILIDAD

La diferencia absoluta entre dos resultados individuales obtenidos con una materia idéntica sometida a ensayo, por un mismo operador, empleando los mismos instrumentos, en el intervalo de tiempo más corto, no sobrepasará el valor de repetibilidad r en más del 5 % de los casos.

r = 11 mg/l.

7.2. LIMITE DE REPRODUCIBILIDAD

La diferencia absoluta entre dos resultados individuales obtenidos con una materia idéntica sometida a ensayo en dos laboratorios diferentes no sobrepasará el valor de reproducibilidad R en más del 5 % de los casos.

R = 20 mg/l.

8. OBSERVACIONES

Habida cuenta de la precisión del método, los valores de ácido D-málico inferiores a 50 mg/l deben ser confirmados por medio de otro método de análisis utilizando otro principio de medida, como por ejemplo el de Przyborski *et al.* (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218. 1993).

La muestra de vino en la cubeta no debe ser superior a 0,1 ml para evitar eventuales inhibiciones de la actividad enzimática por los polifenoles.

Apéndice B

Resultados estadísticos de la prueba interlaboratorios

Año de la prueba interlaboratorios: 1995

Número de laboratorios: 8

Número de muestras: 5 con adición de ácido D-málico

Muestra	A	B	C	D	E
Número de laboratorios elegidos tras eliminación de los laboratorios que presentan resultados aberrantes	7	8	7	8	7
Número de laboratorios con resultados aberrantes	1	—	1	—	1
Número de resultados aceptados	35	41	35	41	36
Valor medio (\bar{x}) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Desviación típica de la repetibilidad (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Desviación típica relativa a la repetibilidad (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Límite de repetibilidad (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Desviación típica de la reproducibilidad (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Desviación típica relativa a la reproducibilidad (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Límite de reproducibilidad (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Tipos de muestra:

A: vino tinto; B: vino tinto; C: vino blanco; D: vino blanco; E: vino blanco.*.

ANEXO II

«38. CIANODERIVADOS

(Atención: Respetar las normas de seguridad para las manipulaciones de productos químicos, para la cloramina T, la piridina, el cianuro potásico, ácido clorhídrico, y ácido fosfórico; deshacerse de los productos empleados de manera apropiada y compatible con las normas y reglamentos ecológicos aplicables. Precaución con el ácido cianhídrico liberado en el proceso de destilación del vino acidulado).

1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ácido cianhídrico libre y total del vino se libera por hidrólisis ácida y se separa por destilación. Tras reaccionar con la cloramina T y la piridina, el dialdehído glutacónico formado se determina mediante colorimetría, gracias a la coloración azul que da con el ácido 1,3-dimetilbarbitúrico.

2. MATERIAL

2.1. Aparato de destilación

Utilizar el aparato de destilación descrito para la determinación del grado alcohólico del vino.

2.2. Matraz redondo de esmerilado normalizado, de 500 ml.

2.3. Baño de agua, que permita la regulación a 20 °C.

2.4. Espectrofotómetro que permita medir la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm.

2.5. Cubetas de vidrio o de un solo uso, de 20 mm de trayecto óptico.

3. REACTIVOS

3.1. Ácido fosfórico (H_3PO_4) al 25 % (m/v).

3.2. Solución de cloramina T ($C_7H_7ClNNa O_2S, 3H_2O$) al 3 % (m/v).

3.3. Solución de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico: disolver 3,658 g de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico ($C_6H_8N_2O_3$) en 15 ml de piridina y 3 ml de ácido clorhídrico ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml) y enrasar a 50 ml con agua destilada.

3.4. Cianuro de potasio (KCN).

3.5. Solución de yoduro de potasio (KI) al 10 % (m/v).

3.6. Solución de nitrato de plata ($AgNO_3$), 0,1 M.

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Destilación

En el matraz de 500 ml (2.2), colocar 25 ml de vino, 50 ml de agua destilada, 1 ml de ácido fosfórico (3.1) y algunas perlas de vidrio. Colocar inmediatamente el matraz en el aparato de destilación. Recoger el destilado, mediante una alargadera, en un matraz aforado de 50 ml que contenga 10 ml de agua y esté sumergido en agua helada. Recoger de 30 a 35 ml de destilado (esto es, hasta que haya en total unos 45 ml de líquido en el matraz aforado).

Lavar la alargadera del refrigerante con algunos mililitros de agua destilada, llevar el destilado a 20 °C y enrasar con agua destilada.

4.2. Medida

Poner 25 ml de destilado en un matraz Erlenmeyer de 50 ml provisto de tapón esmerilado, añadir 1 ml de solución de cloramina T (3.2) y cerrar herméticamente. Transcurridos 60 segundos exactamente, añadir 3 ml de solución de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (3.3), cerrar herméticamente y dejar en reposo durante 10 minutos. A continuación, medir la absorbancia con relación al testigo (25 ml de agua destilada en lugar de 25 ml de destilado) a una longitud de onda de 590 nm en las cubetas de 20 mm de trayecto óptico.

5. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO

5.1. Valoración argentimétrica del cianuro de potasio

En un matraz aforado de 300 ml, disolver unos 0,2 g de KCN (3.4) exactamente pesados en 100 ml de agua destilada. Añadir 0,2 ml de solución de yoduro de potasio (3.5) y valorar con la solución de nitrato de plata 0,1 M (3.6) hasta obtener una coloración amarillenta estable.

Sabiendo que 1 ml de solución 0,1 M de nitrato de plata corresponde a 13,2 mg de KCN, calcular la concentración de KCN de la muestra.

5.2. Curva patrón

5.2.1. Preparación de soluciones patrón

Una vez determinada la concentración del KCN de acuerdo con el punto 5.1, preparar una solución patrón que contenga 30 mg/l de ácido cianhídrico (30 mg de HCN \cong 72,3 mg de KCN). Diluir esta solución a 1/10.

Introducir 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 ml de la solución patrón diluida en matraces aforados de 100 ml y enrasar con agua destilada. Las soluciones preparadas contienen 30, 60, 90, 120 y 150 $\mu\text{g/l}$ de ácido cianhídrico, respectivamente.

5.2.2. Determinación

Tomar 25 ml de las soluciones así obtenidas y continuar como se indica en los puntos 4.1 y 4.2.

Los valores de absorbancia obtenidos con estas soluciones patrón, representados frente a los contenidos en ácido cianhídrico correspondientes, se alinean sobre una recta que pasa por el origen.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El ácido cianhídrico se expresa en microgramos por litro ($\mu\text{g/l}$) sin decimales.

6.1. Cálculo

Leer el contenido en ácido cianhídrico en la curva patrón. Si se ha efectuado dilución, multiplicar el resultado por el factor de dilución.

Límite de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R)

Vino blanco: $r = 3,1 \mu\text{g/l}$ es decir, aproximadamente $6\% \cdot x_i$

$R = 12 \mu\text{g/l}$ es decir, aproximadamente $25\% \cdot x_i$

Vino tinto: $r = 6,4 \mu\text{g/l}$ es decir, aproximadamente $8\% \cdot x_i$

$R = 23 \mu\text{g/l}$ es decir, aproximadamente $29\% \cdot x_i$

x_i = concentración media de HCN en el vino

$x_i = 48,4 \mu\text{g/l}$ en el caso del vino blanco

$x_i = 80,5 \mu\text{g/l}$ en el caso del vino tinto.»

ANEXO III

44. DETERMINACIÓN DEL CARBAMATO DE ETILO EN EL VINO: MÉTODO DE DETECCIÓN SELECTIVA POR CROMATOGRAFÍA EN FASE GASEOSA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS

(Aplicable a la determinación del carbamato de etilo para concentraciones comprendidas entre 10 y 200 µg/l)

(*Atención:* Respetar las normas de seguridad para las manipulaciones de productos químicos, para el etanol, la acetona y los productos cancerígenos: carbamato de etilo y diclorometano; deshacerse de los disolventes empleados de manera apropiada y compatible con las normas y reglamentos ecológicos aplicables).

A. Principio del método

El carbamato de propilo se añade a la muestra como patrón interno, la solución se diluye con agua y se sitúa en una columna de extracción en fase sólida de 50 ml. El carbamato de etilo y el carbamato de propilo son eluidos con diclorometano.

El eluido se concentra con ayuda de un evaporador rotativo al vacío. El concentrado se analiza por cromatografía en fase gaseosa (CG) y la detección se realiza por espectrometría de masa por fragmentometría en modo SIM (*selected ions monitoring*).

B. Material y condiciones cromatográficas (dadas como ejemplo)

- a) Cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (CG/EM) y eventualmente un inyector automático y un sistema de tratamiento de datos o equivalente.

Columna capilar de sílice fundida 30 m (*) x 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 µm de película de tipo Carbowax 20M.

Procedimiento: inyector 180 °C, gas portador helio a 1 ml/minuto, y a 25 °C, inyección según el modo «*Splitless/split*».

Programa de temperatura: 40 °C durante 0,75 minutos; a continuación, programación a 10 °C/minutos hasta 60 °C; luego, 3 °C/minutos hasta 150 °C (**), alcanzar los 220 °C y mantener a esa temperatura durante 4,25 minutos. El tiempo de retención específica del carbamato de etilo es de 23-27 minutos; el del carbamato de propilo es de 27-31 minutos.

Interfase de cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM): línea de transferencia 220 °C. Parámetros del espectrómetro de masas puestos a punto manualmente con perfluorotributilamina y optimizados para una sensibilidad mayor a masas bajas, en modo adquisición SIM, tiempo de espera para el solvente y comienzo de la adquisición 22 minutos, tiempo de mantenimiento/ión 100 ms.

- b) Evaporador rotativo al vacío o sistema de concentración de tipo Kuderna Danish

(*NB.* La tasa de recuperación del carbamato de etilo de la muestra problema C [g]) debe estar comprendida entre un 99 y un 110 % durante el proceso).

- c) Matraz en forma de pera de 300 ml y cuello único esmerilado.

- d) Tubo de concentración de 4 ml, graduado con junta con película de teflón y tapón.

C. Reactivos

- a) Acetona- calidad LC

NB: Verificar cada lote antes de su uso por CG/EM en lo que respecta a la ausencia de respuesta para los iones de m/z 62, 74 y 89.

- b) Diclorometano

NB: Analizar cada lote antes de su uso por CG/EM tras concentrar 200 veces, a fin de comprobar la ausencia de respuesta para los iones de m/z 62, 74 y 89.

- c) Etanol — anhidro

(*) En el caso de determinados vinos especialmente ricos, puede ser conveniente utilizar una columna capilar de 50 m de largo.

(**) En el caso de determinados vinos especialmente ricos, puede ser conveniente realizar una programación de temperatura de 2 °C por minuto.

- d) Carbamato de etilo (CE), soluciones patrón
1. Solución «madre» — 1,00 mg/ml. Pesar 100 mg de CE (≥ 99 % de pureza) en un matraz aforado de 100 ml y enrasar con acetona.
 2. Solución patrón de trabajo — 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Transferir 1 ml de la solución «madre» de CE a un matraz aforado de 100 ml y enrasar con acetona.
- e) Carbamato de propilo (CP), soluciones patrón:
1. Solución «madre» — 1,00 mg/ml. Pesar 100 mg de CP (calidad reactivo) en un matraz aforado de 100 ml y enrasar con acetona.
 2. Solución patrón de trabajo — 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Transferir 1 ml de la solución «madre» de CP a un matraz aforado de 100 ml y enrasar con acetona.
 3. Solución de patrón interno de CP — 400 ng/ml. Transferir 4 ml de solución patrón de trabajo de CP a un matraz aforado de 100 ml y enrasar con agua.
- f) Soluciones patrón calibradas de CE-CP
- Diluir las soluciones patrón de trabajo de CE, (d) (2) y CP (e) (2) con diclorometano para obtener:
1. (100 ng CE y 400 ng CP)/ml,
 2. (200 ng CE y 400 ng CP)/ml,
 3. (400 ng CE y 400 ng CP)/ml,
 4. (800 ng CE y 400 ng CP)/ml,
 5. (1 600 ng CE y 400 ng CP)/ml.
- g) Muestra de prueba — 100 ng CE/ml en 40 % de etanol.
- Transferir 1 ml de las soluciones patrón de trabajo de CE, [d] 2] a un matraz aforado de 100 ml y enrasar con etanol al 40 % en agua.
- h) Columna de extracción en fase sólida — Material desechable, preenvasado con tierra de diatomeas, con una capacidad de 50 ml.
- NB:* Antes del análisis, debe comprobarse cada lote de columnas de extracción respecto a la recuperación de CE y de CP y la ausencia de respuesta para los iones de m/z 62, 74 y 89. Preparar 100 ng CE/ml de muestra problema g). Analizar 5,00 ml de la muestra de prueba como se describe en D [a], E y F. La recuperación de 90-110 ng de CE/ml es satisfactoria. Los absorbentes con un diámetro de partículas irregular pueden producir flujos muy lentos que afectan a la recuperación de CE y de CP. Si, tras varios ensayos, no se obtiene el 90-110 % del valor de la muestra de prueba, se debe cambiar la columna o utilizar una curva de calibración corregida por la recuperación para cuantificar el CE. A fin de obtener la curva de calibración corregida, se deben preparar soluciones patrón como se describe en f) utilizando un etanol del 40 % en lugar de diclorometano.
- Analizar 1 ml de la solución patrón de calibrado como se describe en D, E y F.
- Construir una nueva curva de calibración utilizando la relación CE/CP de los patrones extraídos.

D. Preparación de la muestra problema

Colocar el material problema en dos vasos separados de 100 ml utilizando las cantidades siguientes:

- a) Vino con más del 14 % vol de alcohol: 5,00 ml \pm 0,01 ml
- b) Vinos con un 14 % vol. de alcohol como máximo: 20,00 ml \pm 0,01 ml.

En cada vaso, añadir 1 ml de solución CP de patrón interno, C [e], 3], y agua, a fin de obtener un volumen total de 40 ml (o 40 g).

E. Extracción

Efectuar la extracción bajo la vitrina de gases con una ventilación adecuada.

Transferir la preparación indicada en D a la columna de extracción.

Lavar el vaso con 10 ml de agua y transferir el agua de lavado a la columna.

Dejar el líquido absorberse en la columna durante 4 minutos. Eluir con 2 x 80 ml de diclorometano. Recoger el eluido en un matraz Erlenmeyer de 300 ml.

Evaporar el eluido hasta que queden 2 o 3 ml con ayuda del evaporador rotativo al baño María a 30 °C (NB: No dejar evaporar hasta sequedad total).

Transferir el residuo concentrado a un tubo graduado de 4 ml, con ayuda de una pipeta Pasteur.

Lavar el recipiente con 1 ml de diclorometano y transferir el líquido de lavado al tubo. Concentrar la muestra hasta 1 ml bajo una débil corriente de nitrógeno.

Transvasar el concentrado a un recipiente del inyector automático para análisis por CG/EM.

F. Análisis por CG/EM

a) Curva de calibración

Inyectar 1 µl de cada solución patrón de calibración C(f), en el sistema CG/EM. Hacer el gráfico de relación de áreas CE-CP para la respuesta del ion m/z 62 en el eje de ordenadas y llevar al de abscisas la cantidad de CE en ng/ml (es decir, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/ml).

b) CE cuantificación

Inyectar 1 µl de extracto concentrado de E en el sistema CG/SM y calcular la relación de áreas CE — CP para el ion m/z 62. Determinar la concentración de CE (ng/ml) en el extracto, utilizando la curva de calibración, con patrón interno. Calcular la concentración de CE en la muestra de prueba (ng/ml) dividiendo la cantidad de CE (ng) en el extracto por el volumen de la muestra de prueba (ml).

c) Comprobación de la pureza del CE

Determinar si las respuestas para los iones de m/z 62, 74 y 89 aparecen al tiempo de retención del CE. Estas respuestas son las características respectivamente de los principales fragmentos (M - C₂H₂)⁺ y (M - CH₃)⁺ del ión molecular (M). La presencia de CE está confirmada si las proporciones relativas de estos iones no sobrepasa el 20 % de las proporciones para el patrón en CE. Puede ser necesario reconcentrar el extracto a fin de obtener una respuesta suficiente para el ión de m/z 89.

G. Análisis colaborativo

En el cuadro figuran los distintos resultados relativos a la muestra de prueba práctica y a los dos tipos de vinos.

La aplicación de la prueba de Cochran ha tenido como consecuencia la eliminación de un solo par de resultados, tanto para el vino cuyo grado alcohólico es superior al 14 % vol como para el vino cuyo grado alcohólico es inferior o igual al 14 % vol, de los que cada uno procede de un laboratorio distinto.

La reproducibilidad relativa tiende a decrecer con el aumento de la concentración de carbamato de etilo.

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

Muestra	Media de CE hallado (ng/ml)	Recuperación de CE añadido (%)	S _r	S _R	RSD _r (%)	RSD _R (%)
Vino 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
Vino 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