**Dette dokument er et dokumentationsredskab, og institutionerne påtager sig intet ansvar herfor**

►**B**

# KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 2870/2000
## af 19. december 2000
## om EF-referenceanalysemetoder for spiritus

(EFT L 333 af 29.12.2000, s. 20)

Ændret ved:

| | | Tidende | | |
|---|---|---|---|---|
| | | nr. | side | dato |
| ►**M1** | Kommissionens forordning (EF) nr. 2091/2002 af 26. november 2002 | L 322 | 11 | 27.11.2002 |

▼B

# KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 2870/2000

## af 19. december 2000

## om EF-referenceanalysemetoder for spiritus

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 1576/89 af 29. maj 1989 om fastlæggelse af almindelige regler for definition, betegnelse og præsentation af spiritus ([1]), senest ændret ved akten vedrørende Østrigs, Finlands og Sveriges tiltrædelse, særlig artikel 4, stk. 8, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Artikel 4, stk. 8, i forordning (EØF) nr. 1576/89 fastsætter, at der skal vedtages analysemetoder for spiritus. Ved officiel kontrol af, om bestemmelserne i forordning (EØF) nr. 1576/89 og Kommissionens forordning (EØF) nr. 1014/90 af 24. april 1990 om gennemførelsesbestemmelser for definition af betegnelse for og præsentation af spiritus ([2]), senest ændret ved forordning (EF) nr. 2140/98 ([3]), er overholdt, og i tilfælde af tvist, bør der benyttes referencemetoder.

(2) Det vil være nyttigt, at man ved vedtagelse og beskrivelse af EF-referenceanalysemetoder så vidt muligt benytter sig af generelt anerkendte metoder.

(3) For at tage hensyn til de videnskabelige fremskridt og det forskelligartede udstyr på de officielle laboratorier bør det tillades, at der under den pågældende laboratorieleders ansvar benyttes metoder baseret på andre måleprincipper end de referencemetoder, der er beskrevet i bilaget til denne forordning, hvis sådanne metoder giver tilstrækkelige garantier for resultaterne og især svarer til kriterierne i Rådets direktiv 85/591/EØF af 20. december 1985 om indførelse af fælles prøveudtagnings- og analysemetoder til kontrol af levnedsmidler ([4]), og hvis det kan godtgøres, at disse metoder har mindst samme nøjagtighed, repeterbarhed og reproducerbarhed som de i denne forordning beskrevne referencemetoder. Hvis denne betingelse er opfyldt, bør det tillades at anvende andre analysemetoder. Det bør dog præciseres, at disse andre metoder ikke kan erstatte referencemetoderne i tilfælde af tvist.

(4) De i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Gennemførelseskomitéen for Spiritus —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

*Artikel 1*

De EF-referenceanalysemetoder for spiritus, som i tilfælde af

— officiel kontrol, eller

— tvist

benyttes til at kontrollere, at bestemmelserne i forordning (EØF) nr. 1576/89 og (EØF) nr. 1014/90 er overholdt, er anført i bilaget til nærværende forordning.

*Artikel 2*

Uanset artikel 1, første led, er det under ansvar af lederen af et laboratorium tilladt at benytte andre analysemetoder på betingelse af, at de

([1]) EFT L 160 af 12.6.1989, s. 1.
([2]) EFT L 105 af 25.4.1990, s. 9.
([3]) EFT L 270 af 7.10.1998, s. 9.
([4]) EFT L 372 af 31.12.1985, s. 50.

▼B

har mindst samme nøjagtighed og præcision (repeterbarhed og reproducerbarhed) som analysemetoderne i bilaget.

*Artikel 3*

Hvis der ikke er fastsat EF-referenceanalysemetoder til påvisning og kvantitativ bestemmelse af de eftersøgte stoffer i det pågældende produkt, kan følgende metoder anvendes:

a) analysemetoder, der er valideret efter internationalt anerkendte procedurer, og som navnlig opfylder kriterierne i bilaget til direktiv 85/591/EØF

b) analysemetoder, der er i overensstemmelse med de standarder, der anbefales af ISO (Den Internationale Standardiseringsorganisation)

c) analysemetoder, der er godkendt af generalforsamlingen for Office international de la vigne et du vin (OIV) og offentliggjort på dennes foranledning

d) hvis en af de i litra a), b) og c) omhandlede metoder ikke forefindes, da på grund af metodens nøjagtighed, repeterbarhed og reproducerbarhed:

   — en analysemetode tilladt af den berørte medlemsstat

   — om nødvendigt en anden egnet analysemetode.

*Artikel 4*

I denne forordning forstås ved:

a) »repeterbarhedsgrænse«: den værdi, under hvilken den absolutte forskel mellem to enkeltresultater af målinger foretaget under samme betingelser (samme person, samme apparatur, samme laboratorium og et kort tidsinterval) forventes at ligge med en sandsynlighed på 95 % (ISO 3534-1)

b) »reproducerbarhedsgrænse«: den værdi, under hvilken den absolutte forskel mellem to enkeltresultater af målinger foretaget under forskelligartede betingelser (forskellige personer, forskelligt apparatur og forskellige laboratorier) forventes at ligge med en sandsynlighed på 95 % (ISO 3534-1)

c) »nøjagtighed«: størrelsen af afvigelsen mellem det fundne resultat og den anerkendte referenceværdi (ISO 3534-1).

*Artikel 5*

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

Den anvendes fra den 1. januar 2001.

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

▼B

*BILAG*

**BESKRIVELSE AF REFERENCEANALYSEMETODER FOR FØLGENDE PARAMETRE**

I. Bestemmelse af alkoholindhold, volumenkoncentration

Bilag I: Fremstilling af destillat

Bilag II: Måling af destillatets densitet

— Metode A: Pyknometri

— Metode B: Elektronisk densimetri

— Metode C: Hydrostatisk vægt

II. Bestemmelse af totalt tørstofindhold (gravimetrisk metode)

III. Bestemmelse af flygtige stoffer og methanol

III.1 Generelle bemærkninger

III.2 Flygtige beslægtede stoffer: aldehyder, højere alkoholer, ethylacetat og methanol (gaskromatografi)

III.3 Flygtige syrer (p.m.)

IV. Cyanbrinte (blåsyre) (p.m.)

V. Anethol ►**M1** ——— ◄

VI. Glycyrrhizinsyre ►**M1** ——— ◄

VII. Chalconer ►**M1** ——— ◄

VIII. Totalt sukkerindhold (p.m.)

IX. Æggeblomme ►**M1** ——— ◄

▼B

## I. REFERENCEMETODE TIL BESTEMMELSE AF VOLUMENKONCENTRATIONEN AF ALKOHOL I SPIRITUS

**Indledning**

Referencemetoden indeholder to bilag:

Bilag I: Fremstilling af destillat

Bilag II: Måling af destillatets densitet

1. **Anvendelsesområde**

Metoden er egnet til bestemmelse af den faktiske volumenkoncentration af alkohol i spiritus.

2. **Normative referencer**

ISO 3696:1987: Vand til analytisk laboratoriebrug. Specifikation og prøvningsmetoder.

3. **Udtryk og definitioner**

3.1. *Referencetemperatur:*

Referencetemperaturen for bestemmelse af volumenkoncentrationen af alkohol i spiritus og densitet og relativ densitet af spiritus er 20 ºC.

Anm. 1: Udtrykket »ved t ºC« er forbeholdt målinger (af densitet og volumenkoncentration af alkohol) ved en anden temperatur end referencetemperaturen 20 ºC.

3.2. *Densitet:*

Densiteten er massen pr. volumenenhed i vakuum af spiritus ved 20 ºC. Den angives i kilogram pr. kubikmeter og har symbolet $\rho_{20\,°C}$ eller $\rho_{20}$.

3.3. *Relativ densitet:*

Den relative densitet er forholdet mellem densiteten af spiritussen ved 20 ºC og vand ved samme temperatur, udtrykt som decimalbrøk. Hertil benyttes symbolet $d_{20\,°C/20\,°C}$ eller $d_{20/20}$, eller blot d, når der ikke er mulighed for forveksling. Den målte parameter skal angives på prøvningsattesten ved hjælp af ovennævnte symboler og ingen andre.

Anm. 2: Det er muligt at finde den relative densitet ud fra densiteten $\rho_{20}$ ved 20 ºC:

$\rho_{20} = 998{,}203 \times d_{20/20}$ eller $d_{20/20} = \rho_{20}/998{,}203$ hvor 998,203 er densiteten af vand ved 20 ºC.

3.4. *Faktisk volumenkoncentration af alkohol:*

Den faktiske volumenkoncentration af alkohol i spiritus er lig med det antal liter ethylalkohol, der er indeholdt i 100 l af en vand/alkohol-blanding med samme densitet som alkoholen eller spiritussen efter destillation. Som referenceværdier for volumenkoncentration af alkohol ( % vol.) ved 20 ºC mod densiteten ved 20 ºC for forskellige vand/alkohol-blandinger skal benyttes de værdier, der er opgivet i den internationale tabel, som Den Internationale Organisation for Retslig Metrologi har vedtaget i sin rekommandation nr. 22.

Den generelle ligning for sammenhængen mellem volumenkoncentrationen af alkohol og densiteten (massefylden) af en vand/alkohol-blanding ved en given temperatur findes på side 40 i bilaget til Kommissionens forordning (EØF) nr. 2676/90, kapitel 3, »Alkoholindhold udtrykt i volumen« (EFT L 272 af 3.10.1990, s. 1), eller i OIV's manual for analysemetoder (1994), s. 17.

Anm. 3: For likører, hvis volumen er meget vanskeligt at måle nøjagtigt, vejes prøven, og alkoholindholdet beregnes først i massekoncentration.

Omregningsformel:

$$\text{Volumenkoncentration af alkohol (\% vol.)} = \frac{\text{ASM (masseprocent)} \times \rho_{20}\,\text{(prøve)}}{\rho_{20}\,\text{(alkohol)}}$$

hvor ASM = massekoncentrationen af alkohol

▼B

$\rho_{20}$ (alkohol) = 789,24 kg/m³.

4. **Princip**

Efter destillation bestemmes destillatets volumenkoncentration af alkohol ved pyknometri, elektronisk densimetri eller densimetri med hydrostatisk vægt.

▼B

BILAG I: FREMSTILLING AF DESTILLAT

1. **Anvendelsesområde**

Metoden er egnet til fremstilling af destillater til bestemmelse af den faktiske volumenkoncentration af alkohol i spiritus.

2. **Princip**

Spiritussen destilleres, så ethylalkohol og andre flygtige forbindelser adskilles fra ekstraktivstofferne (stoffer, der ikke destilleres).

3. **Reagenser og materialer**

3.1. Granulat mod stødkogning.

3.2. Koncentreret skumhindrende emulsion (til likører).

4. **Apparatur og udstyr**

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder følgende:

4.1. Vandbad med en temperatur på 10-15 ºC.

Vandbad med en temperatur på 20 ºC (± 0,2 ºC).

4.2. Målekolber (100 og 200 ml) af klasse A, der er certificeret til henholdsvis ± 0,1 % og ± 0,15 %.

4.3. Destillationsapparat:

4.3.1. Almindelige krav

Destillationsapparaturet skal opfylde følgende specifikationer:

— Der skal være så få samlinger som muligt, således at det er tæt.

— Det skal være således udformet, at dampen ikke river kogende væske med sig, og således at destillationshastigheden for alkoholrig damp er jævn.

— Kondenseringen af alkoholdampe skal ske hurtigt og fuldstændigt.

— De første destillationsfraktioner skal opsamles i vandigt medium.

Varmekilden skal være så diffus, at der ikke kan forekomme pyrogene reaktioner i ekstraktivstoffet.

4.3.2. Figur 1 viser et eksempel på et egnet destillationsapparat, som består af følgende dele:

— 1 liter rundbundet kolbe med standardslib

— ca. 20 cm lang destillationskolonne (f.eks. Vigreux-kolonne)

— bøjet forbindelsesrør til en ca. 10 cm lang glat svaler (f.eks. West-svaler), der er anbragt lodret

— kølespiral, 40 cm lang

— udtrukket glasrør, der leder destillatet ned i bunden af forlagskolben, som er inddelt med målestreger og indeholder en smule vand.

Anm.: Det ovenfor beskrevne apparatur anvendes til prøver på mindst 200 ml. Mindre prøver kan dog også destilleres, hvis der benyttes en mindre destillationskolbe, forudsat at der benyttes en dråbefanger eller anden anordning til at forhindre medrivning.

5. **Opbevaring af prøver**

Prøver opbevares ved rumtemperatur inden analysen.

6. **Fremgangsmåde**

Indledende bemærkning:

Destillation kan også finde sted efter IUPAC's fremgangsmåde (1968).

6.1. Kontrol af destillationsapparatet

Med apparatet skal det være muligt at foretage følgende:

Ved destillation af 200 ml af en vand/alkohol-blanding med kendt koncentration på ca. 50 % vol. må tabet af alkohol højst være 0,1 % vol.

6.2. Spiritus med alkoholindhold under 50 % vol.

▼B

Der afmåles 200 ml spiritus i en målekolbe.

Væskens temperatur noteres, eller den henstilles ved standardtemperatur (20 ºC).

Prøven hældes over i destillationsapparatets rundbundede kolbe, og målekolben skylles med tre gange 20 ml destilleret vand. Skyllevæsken hældes over i destillationskolben.

Anm.: Denne fortynding med 60 ml er tilstrækkelig for spiritus med op til 250 g tørstof pr. liter. For at undgå pyrolyse ved højere tørstofindhold øges mængden af skyllevand til mindst 70 ml ved et tørstofindhold på 300 g/l, 85 ml ved et tørstofindhold på 400 g/l og 100 ml ved et tørstofindhold på 500 g/l (visse frugtlikører). Disse mængder tilpasses proportionalt i tilfælde af andre prøvestørrelser.

Der tilsættes nogle få korn mod stødkogning (3.1) (og skumdæmper i tilfælde af likør).

Der hældes 20 ml destilleret vand i den oprindelige 200 ml målekolbe, som benyttes til opsamling af destillatet. Kolben anbringes i koldt vandbad (4.1) (10-15 ºC for spiritus med anissmag).

Idet medrivning og svidning undgås og under lejlighedsvis omrøring af kolbens indhold, destilleres der, indtil destillatet er nogle få mm fra målekolbens streg.

Når destillatets temperatur ligger inden for ± 0,5 ºC af væskens begyndelsestemperatur, fyldes der op til mærket med destilleret vand og blandes omhyggeligt.

Destillatet benyttes til bestemmelse af volumenkoncentrationen af alkohol (bilag II).

6.3. Spiritus med alkoholindhold over 50 % vol.

I en 100 ml målekolbe afmåles der 100 ml spiritus, som hældes over i destillationsapparatets rundbundede kolbe.

Målekolben skylles flere gange med destilleret vand, og skyllevæsken hældes over i destillationskolben. Der benyttes så meget vand, at kolbens indhold kommer op på ca. 230 ml.

Der hældes 20 ml destilleret vand i en 200 ml målekolbe, som benyttes til opsamling af destillatet. Kolben anbringes i koldt vandbad (4.1) (10-15 ºC for spiritus med anissmag).

Under lejlighedsvis omrøring af kolbens indhold destilleres der, indtil destillatet er nogle få mm fra målekolbens streg (200 ml).

Når destillatets temperatur ligger inden for ± 0,5 ºC af væskens begyndelsestemperatur, fyldes der op til mærket med destilleret vand og blandes omhyggeligt.

Destillatet benyttes til bestemmelse af volumenkoncentrationen af alkohol (bilag II).

Anm.: Spiritussens volumenkoncentration af alkohol er dobbelt så høj som destillatets.

▼B

BILAG II: MÅLING AF DESTILLATETS DENSITET

## METODE A: BESTEMMELSE AF DEN FAKTISKE VOLUMENKONCENTRATION AF ALKOHOL I SPIRITUS — PYKNOMETRI

A.1. **Princip**

Volumenkoncentrationen af alkohol bestemmes ved måling af destillatets densitet ved pyknometri.

A.2. **Reagenser og materialer**

Under analysen må der kun benyttes reagenser af anerkendt analysekvalitet og vand af mindst klasse 3 if. ISO 3696:1987, medmindre andet er anført.

A.2.1. Natriumchloridopløsning (2 % w/v)

Der afvejes 20 g natriumchlorid, som opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

A.3. **Apparatur og udstyr**

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder følgende:

A.3.1. Analysevægt med aflæsningsnøjagtighed på 0,1 mg.

A.3.2. Termometer med slib, inddelt i tiendedele grader fra 10 til 30 ºC. Termometeret skal være certificeret eller kontrolleres med et certificeret termometer.

A.3.3. Pyknometer af pyrexglas på ca. 100 ml med aftageligt slibtermometer (A.3.2). Pyknometeret skal have et siderør af en længde på 25 mm og (højst) 1 mm indre diameter, som ender i et konisk slib. Andre af de i ISO 3507 beskrevne pyknometre, f.eks. 50 ml, kan benyttes om ønsket.

A.3.4. Tareringsflaske af samme ydre volumen (inden for ± 1 ml) som pyknometret og med samme masse som pyknometret fyldt med en væske med densitet 1,01 (natriumchloridopløsning A.2.1).

A.3.5. Varmeisolerende kappe, der passer nøjagtig omkring pyknometret.

Anm. 1: Metoden til bestemmelse af densiteten af spiritus in vacuo kræver brug af en vægt med to skåle, et pyknometer og en tareringsflaske med samme ydre volumen til udligning af luftens opdrift til ethvert tidspunkt. Denne simple teknik kan også benyttes med en vægt med én skål, så længe en eventuel ændring i luftens opdrift konstateres ved en ny vejning af tareringsflasken.

A.4. **Fremgangsmåde**

Indledende bemærkninger:

Nedenfor følger en beskrivelse af fremgangsmåden ved brug af et 100 ml-pyknometer til bestemmelse af alkoholkoncentrationen; det giver den bedste nøjagtighed. Det er dog også muligt at benytte et mindre pyknometer, f.eks. på 50 ml.

A.4.1. Kalibrering af pyknometret

Pyknometret kalibreres ved bestemmelse af følgende parametre:

— pyknometrets tara
— pyknometrets volumen ved 20 ºC
— massen af det vandfyldte pyknometer ved 20 ºC

A.4.1.1. Kalibrering med en enskålsvægt:

massen af det tørre, rene pyknometer (P)

— massen af det vandfyldte pyknometer ved t ºC (P1)
— massen af tareringsflasken (T0)
— bestemmes.

A.4.1.1.1. Det tørre, rene pyknometer vejes (P).

A.4.1.1.2. Pyknometret fyldes omhyggeligt med destilleret vand ved stuetemperatur, hvorefter termometret sættes på.

▼B

Pyknometret aftørres omhyggeligt og anbringes i den varmeisolerende kappe. Indholdet blandes ved at vende pyknometret på hovedet flere gange, indtil termometret viser konstant temperatur.

Væskeoverfladen bringes i nøjagtigt niveau med siderørets overkant. Temperaturen t ºC aflæses omhyggeligt, og om nødvendigt korrigeres der for unøjagtigheder i temperaturskalaen.

Det vandfyldte pyknometer vejes (P1).

A.4.1.1.3. Tareringsflasken vejes (T0).

A.4.1.1.4. Beregning:

— Tara af tomt pyknometer = P – m

hvor m er massen af luft i pyknometret

m = 0,0012 × (P1 – P)

Anm 2: 0,0012 er densiteten af tør luft ved 20 ºC og et tryk på 760 mmHg.

— Volumen af pyknometret ved 20 ºC:

$V_{20\,°C} = [P1 - (P - m)] \times F_t$

hvor $F_t$ er faktoren F ved temperaturen t ºC i bilaget til forordning (EØF) nr. 2676/90, kapitel 1, »Massefylde og relativ densitet«, tabel I (s. 10).

$V_{20\,°C}$ skal være kendt med en nøjagtighed på 0,001 ml.

— Massen af vandet i pyknometret ved 20 ºC:

$M_{20°C} = V_{20°C} \times 0{,}998203$ hvor 0,998203 er vands densitet ved 20 ºC.

Anm. 3: Om ønsket kan værdien 0,99715 for densiteten i luft benyttes, og alkoholindholdet beregnes med henvisning til den tilsvarende densitet i *HM Customs and Excise* tables i luft; i så fald korrigeres der ikke for massen af den luft, der er fortrængt i pyknometret.

A.4.1.2. Kalibrering med en toskålsvægt:

A.4.1.2.1. Tareringsflasken anbringes på den venstre vægtskål, og det rene og tørre pyknometer med opsamlingsprop på den højre. Vægten bringes i ligevægt ved anbringelse af lodder ved siden af pyknometret: p gram (p).

A.4.1.2.2. Pyknometret fyldes omhyggeligt med destilleret vand ved stuetemperatur, hvorefter termometret sættes på; pyknometret aftørres omhyggeligt og anbringes i den varmeisolerende kappe; indholdet blandes ved at vende pyknometret på hovedet flere gange, indtil termometret viser konstant temperatur.

Væskeoverfladen bringes i nøjagtigt niveau med siderørets overkant. Siderøret aftørres, og opsamlingsproppen sættes på; temperaturen t ºC aflæses omhyggeligt, og om nødvendigt korrigeres der for unøjagtigheder i temperaturskalaen.

Det vandfyldte pyknometer vejes, idet p' er den masse i gram, der skal til for at opnå ligevægt (p').

A.4.1.2.3. Beregning:

— Tara af tomt pyknometer = p + m

hvor m er massen af luft i pyknometret

m = 0,0012 × (p – p')

— Volumen af pyknometret ved 20 º C:

$V_{20\,°C} = (p + m - p') \times F_t$

hvor $F_t$ er faktoren F ved temperaturen t ºC i bilaget til forordning (EØF) nr. 2676/90, kapitel 1, »Massefylde og relativ densitet«, tabel I (s. 10).

$V_{20\,°C}$ skal være kendt med en nøjagtighed på 0,001 ml.

— Massen af vandet i pyknometret ved 20 ºC:

$M_{20°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$

hvor 0,998203 er vands densitet ved 20 ºC.

A.4.2. Bestemmelse af alkoholkoncentrationen i prøven

A.4.2.1. Med en etskålsvægt:

A.4.2.1.1. Tareringsflasken vejes (T1).

A.4.2.1.2. Pyknometret med det fremstillede destillat vejes (se bilag I); P2 er dets masse ved t ºC.

▼B

A.4.2.1.3. Beregning

— dT = T1 - T0

— Massen af det tomme pyknometer på måletidspunktet
= P – m + dT.

— Massen af væsken i pyknometret ved t ºC
= P2 – (P – m + dT).

— Densiteten ved t ºC i g/ml.

— $\rho_{t\,°C} = [P_2 – (P – m + dT)]/V_{20\,°C}$.

— Densiteten ved t ºC udtrykkes i kilogram pr. $m^3$ ved at multiplicere $\rho_{t\,°C}$ med 1 000, og denne værdi betegnes $\rho_t$.

— $\rho_\tau$ omregnes til $\rho_{20}$ ved hjælp af tabellen med densiteter ρT for vand/alkohol-blandinger (tabel II i bilag II til OIV's manual for analysemetoder (1994), s. 17-29).

I tabellen finder man den vandrette linje, der svarer til temperaturen T i hele grader, umiddelbart under t ºC, den laveste densitet større end $\rho_t$. Differensen i tabellen under denne densitet benyttes til at beregne densiteten $\rho_t$ af spiritussen ved denne temperatur T i hele grader.

— På linjen med den hele temperatur beregnes differensen mellem densiteten ρ' i tabellen umiddelbart omkring $\rho_t$ og den beregnede densitet $\rho_t$. Denne differens divideres med tabeldifferensen til højre for ρ'. Kvotienten udgør decimaldelen af alkoholkoncentrationen, mens heltalsdelen af alkoholkoncentrationen står øverst i den kolonne, hvor densiteten ρ' er fundet (Dt, alkoholkoncentrationen).

Anm. 4: Alternativt kan pyknometret stilles i vandbad ved 20 ± 0,2 ºC, når der fyldes op til mærket.

A.4.2.1.4. Resultat

Ud fra densiteten $\rho_{20}$ beregnes den faktiske alkoholkoncentration ud fra følgende tabeller over alkoholkoncentration:

Den tabel, der indeholder volumenkoncentrationen af alkohol (% vol.) ved 20 ºC som funktion af densiteten ved 20 ºC af vand/alkohol-blandinger, er den internationale tabel, som Den Internationale Organisation for Retslig Metrologi har vedtaget i sin rekommandation nr. 22.

A.4.2.2. Med en toskålsvægt:

A.4.2.2.1. Pyknometret vejes med det fremstillede destillat (se del I), p″ er massen ved t ºC.

A.4.2.2.2. Beregning:

— Massen af væsken i pyknometret ved t ºC
= p + m – p″.

— Densiteten ved t ºC i g/ml:
$\rho_{t\,°C} = (p + m – p'')/V_{20\,°C}$.

— Densiteten ved t ºC udtrykkes i kilogram pr. $m^3$, og der foretages samme temperaturkorrektion som for etskålsvægten ovenfor for at nå frem til alkoholkoncentrationen ved 20 ºC.

A.5. **Metodens kvalitetsparametre (præcision)**

A.5.1. Statistiske resultater af interkalibrering

Følgende data kommer fra en international metodekvalitetsundersøgelse, der er foretaget efter internationalt anerkendte procedurer [1] [2].

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 20 |
| Antal prøver: | 6. |

| Prøve | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 19 | 20 | 17 | 19 | 19 | 17 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 1 | — | 2 | 1 | 1 | 3 |

▼B

| Prøve | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antal accepterede resultater | 38 | 40 | 34 | 38 | 38 | 34 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) % vol. | 23,77 | 40,04 | 40,29 | 39,20 | 42,24 | 57,03 |
| | 26,51 (*) | | | 42,93 (*) | 45,73 (*) | 63,03 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (% vol.) | 0,106 | 0,176 | 0,072 | 0,103 | 0,171 | 0,190 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 0,42 | 0,44 | 0,18 | 0,25 | 0,39 | 0,32 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (% vol.) | 0,30 | 0,49 | 0,20 | 0,29 | 0,48 | 0,53 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (% vol.) | 0,131 | 0,236 | 0,154 | 0,233 | 0,238 | 0,322 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 0,52 | 0,59 | 0,38 | 0,57 | 0,54 | 0,53 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (% vol.) | 0,37 | 0,66 | 0,43 | 0,65 | 0,67 | 0,90 |

Prøvetyper:
A frugtlikør; to niveauer (*)
B brandy; blind dobbeltbestemmelse
C whisky; blind dobbeltbestemmelse
D grappa; to niveauer (*)
E akvavit; to niveauer (*)
F rom; to niveauer (*).

## METODE B: BESTEMMELSE AF DEN FAKTISKE VOLUMENKONCENTRATION AF ALKOHOL I SPIRITUS — MÅLING VED ELEKTRONISK DENSIMETRI (BASERET PÅ EN PRØVES RESONANSFREKVENS I EN OSCILLATIONSCELLE)

B.1. **Princip**

Væskens densitet bestemmes ved elektronisk måling af oscillationerne i et vibrerende U-rør. Ved målingen adderes prøven til et oscillerende system, hvis oscillationsfrekvens ændres af den således tilføjede masse.

B.2. **Reagenser og materialer**

Under analysen må der kun benyttes reagenser af anerkendt analysekvalitet og vand af mindst klasse 3 if. ISO 3696:1987, medmindre andet er anført.

B.2.1. Acetone (CAS 666-52-4) eller absolut alkohol.

B.2.2. Tør luft.

B.3. **Apparatur og udstyr**

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder følgende:

B.3.1. Densimeter med digitalt display

Elektroniske densimetre til sådanne målinger skal kunne vise densitet i g/ml med fem decimaler.

Anm. 1: Densimeteret skal anbringes på et helt stabilt underlag, der er isoleret fra alle vibrationer.

B.3.2. Temperaturregulering

Densimeterets målinger er kun gyldige, hvis målecellen er forbundet med en indbygget temperaturregulator, der kan præstere en temperaturstabilitet på ± 0,02 ºC eller bedre.

Anm. 2: Det er af stor betydning, at temperaturen i målecellen indstilles nøjagtigt, og at der holdes øje med den, idet en fejl på 0,1 ºC kan medføre en densitetsafvigelse af størrelsesordenen 0,1 kg/m$^3$.

B.3.3. Prøveinjektionssprøjter eller autosampler.

▼B

B.4. **Fremgangsmåde**

B.4.1. Kalibrering af densimeteret

Apparatet kalibreres efter fabrikantens anvisninger, når det tages i brug. Det kalibreres regelmæssigt og kontrolleres mod en certificeret referencestandard eller en laboratorieintern referenceopløsning, der er knyttet til en certificeret referencestandard.

B.4.2. Bestemmelse af prøvens densitet

B.4.2.1. Om nødvendigt kan cellen inden målingen rengøres med acetone eller absolut alkohol og tørres med tør luft. Cellen skylles med prøven.

B.4.2.2. Prøven sprøjtes ind i cellen (med en injektionssprøjte eller autosampler), således at cellen er helt fuld. Under påfyldningen sørges der for, at der ikke dannes luftbobler. Prøven skal være homogen og må ikke indeholde nogen partikler. Eventuelt opslæmmet materiale fjernes ved filtrering inden analysen.

B.4.2.3. Når aflæsningen er stabil, noteres den densitet $\rho_{20}$ eller alkoholkoncentration, som densimeterets display viser.

B.4.3. Resultat

Når densiteten $\rho_{20}$ benyttes, beregnes den faktiske alkoholkoncentration ud fra følgende tabeller over alkoholkoncentration:

Den tabel, der indeholder volumenkoncentrationen af alkohol (% vol.) ved 20 ºC som funktion af densiteten ved 20 ºC af vand/alkohol-blandinger, er den internationale tabel, som Den Internationale Organisation for Retslig Metrologi har vedtaget i sin rekommandation nr. 22.

B.5. **Metodens kvalitetsparametre (præcision)**

B.5.1. Statistiske resultater af interkalibrering

Følgende data kommer fra en international metodekvalitetsundersøgelse, der er foretaget efter internationalt anerkendte procedurer [1] [2].

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 16 |
| Antal prøver: | 6. |

| Prøve | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 11 | 13 | 15 | 16 | 14 | 13 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 2 | 3 | 1 | — | 1 | 2 |
| Antal accepterede resultater | 22 | 26 | 30 | 32 | 28 | 26 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (% vol.) | 23,81 | 40,12 | 40,35 | 39,27 | 42,39 | 56,99 |
| | 26,52 (*) | | | 43,10 (*) | 45,91 (*) | 63,31 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (% vol.) | 0,044 | 0,046 | 0,027 | 0,079 | 0,172 | 0,144 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 0,17 | 0,12 | 0,07 | 0,19 | 0,39 | 0,24 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (% vol.) | 0,12 | 0,13 | 0,08 | 0,22 | 0,48 | 0,40 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (% vol.) | 0,054 | 0,069 | 0,083 | 0,141 | 0,197 | 0,205 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 0,21 | 0,17 | 0,21 | 0,34 | 0,45 | 0,34 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (% vol.) | 0,15 | 0,19 | 0,23 | 0,40 | 0,55 | 0,58 |

Prøvetyper:
A frugtlikør; to niveauer (*)
B brandy; blind dobbeltbestemmelse
C whisky; blind dobbeltbestemmelse

▼B

D grappa; to niveauer (*)
E akvavit; to niveauer (*)
F rom; to niveauer (*).

▼B

## METODE C: BESTEMMELSE AF DEN FAKTISKE VOLUMENKONCENTRATION AF ALKOHOL I SPIRITUS — MÅLING AF DENSITET VED HJÆLP AF EN HYDROSTATISK VÆGT

C.1. **Princip**

Alkoholindholdet i spiritus kan måles ved densitetsmåling ved hjælp af en hydrostatisk vægt, som bygger på Archimedes's princip om, at et legeme, der nedsænkes i en væske, påvirkes af en lodret opadgående kraft svarende til massen af den fortrængte væskemængde.

C.2. **Reagenser og materialer**

Under analysen må der kun benyttes reagenser af anerkendt analysekvalitet og vand af mindst klasse 3 if. ISO 3696:1987, medmindre andet er anført.

C.2.1. Opløsning til rengøring af flyder (natriumhydroxid, 30 % w/v)

Til fremstilling af 100 ml opløsning afvejes der 30 g natriumhydroxid, som fortyndes med 96 % (v/v) ethanol.

C.3. **Apparatur og udstyr**

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder følgende:

C.3.1. Hydrostatisk vægt med én skål med en følsomhed på 1 mg.

C.3.2. Flyder med et volumen på mindst 20 ml, som er særligt tilpasset til vægten, og som er ophængt i en tråd med en diameter på højst 0,1 mm.

C.3.3. Måleglas med niveaumærke. Hele flyderen skal kunne rummes i måleglasset under niveaumærket, således at væskeoverfladen kun gennemskæres af ophængningstråden. Måleglassets indvendige diameter skal være mindst 6 mm større end flyderens.

C.3.4. Termometer (eller termoføler) inddelt i hele og tiendedele grader fra 10 til 40 ºC, kalibreret til 0,05 ºC.

C.3.5. Lodder, kalibreret af et anerkendt certificeringsorgan.

Anm. 1: Der kan også benyttes en vægt med to vægtskåle; princippet er beskrevet i bilaget til forordning (EØF) nr. 2676/90, kapitel 1, »Massefylde og relativ densitet« (s. 7).

C.4. **Fremgangsmåde**

Flyder og måleglas rengøres mellem hver måling med destilleret vand, aftørres med fnugfrit papir og skylles med den opløsning, hvis densitet skal bestemmes. Målingerne foretages, så snart apparatet er stabilt, således at fordampningstab af alkohol begrænses mest muligt.

C.4.1. Kalibrering af vægten

Vægte har normalt et indbygget kalibreringssystem, men den hydrostatiske vægt skal kunne kalibreres med lodder, der er kontrolleret af et officielt certificeringsorgan.

C.4.2. Kalibrering af flyderen

C.4.2.1. Måleglasset fyldes op til mærket med dobbeltdestilleret vand (eller vand af tilsvarende renhed, f.eks. mikrofiltreret vand med en ledningsevne på 18,2 MΩ/cm) ved en temperatur mellem 15 og 25 ºC, dog helst ved 20 ºC.

C.4.2.2. Flyder og termometer sænkes ned i væsken, der omrøres, og væskens densitet aflæses på apparatet; om nødvendigt korrigeres aflæsningen, så den svarer til densiteten af vand ved måletemperaturen.

C.4.3. Kontrol med en vand/alkohol-opløsning

C.4.3.1. Måleglasset fyldes op til mærket med en vand/alkohol-blanding med kendt koncentration ved en temperatur mellem 15 og 25 ºC, dog helst ved 20 ºC.

C.4.3.2. Flyder og termometer sænkes ned i væsken, der omrøres, og væskens densitet (eller alkoholkoncentration, hvis apparatet tillader det) aflæses på apparatet. Den således bestemte alkoholkoncentration skal være den samme som den tidligere bestemte alkoholkoncentration.

▼B

Anm. 2: Denne opløsning med kendt alkoholkoncentration kan også benyttes til kalibrering af flyderen i stedet for dobbeltdestilleret vand.

C.4.4. Måling af densiteten (eller alkoholkoncentration, hvis apparatet tillader det) af et destillat

C.4.4.1. Måleglasset fyldes op til mærket med prøven.

C.4.4.2. Flyder og termometer sænkes ned i væsken, der omrøres, og væskens densitet (eller alkoholkoncentration, hvis apparatet tillader det) aflæses på apparatet. Temperaturen noteres, hvis densiteten måles ved t ºC ($\rho_t$).

C.4.4.3. $\rho_t$ omregnes til $\rho_{20}$ ved hjælp af tabellen med densiteter ρT for vand/alkohol-blandinger (tabel II i bilag II til OIV's manual for analysemetoder (1994), s. 17-29).

C.4.5. Rengøring af flyder og måleglas

C.4.5.1. Flyderen nedsænkes i flyderrengøringsvæsken i måleglasset.

C.4.5.2. Den henstår i 1 time, idet flyderen af og til drejes rundt.

C.4.5.3. Der skylles med rigeligt ledningsvand og derefter med destilleret vand.

C.4.5.4. Der aftørres med fnugfrit papir.

Dette gøres, når flyderen tages i brug første gang, og derefter jævnligt efter behov.

C.4.6. Resultat

Ud fra densiteten $\rho_{20}$ beregnes den faktiske alkoholkoncentration ved hjælp af følgende tabeller:

Den tabel, der indeholder volumenkoncentrationen af alkohol ( % vol.) ved 20 ºC som funktion af densiteten ved 20 ºC af vand/alkohol-blandinger, er den internationale tabel, som Den Internationale Organisation for Retslig Metrologi har vedtaget i sin rekommandation nr. 22.

C.5. **Metodens kvalitetsparametre (præcision)**

C.5.1. Statistiske resultater af interkalibrering

Følgende data kommer fra en international metodekvalitetsundersøgelse, der er foretaget efter internationalt anerkendte procedurer [1] [2].

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 12 |
| Antal prøver: | 6. |

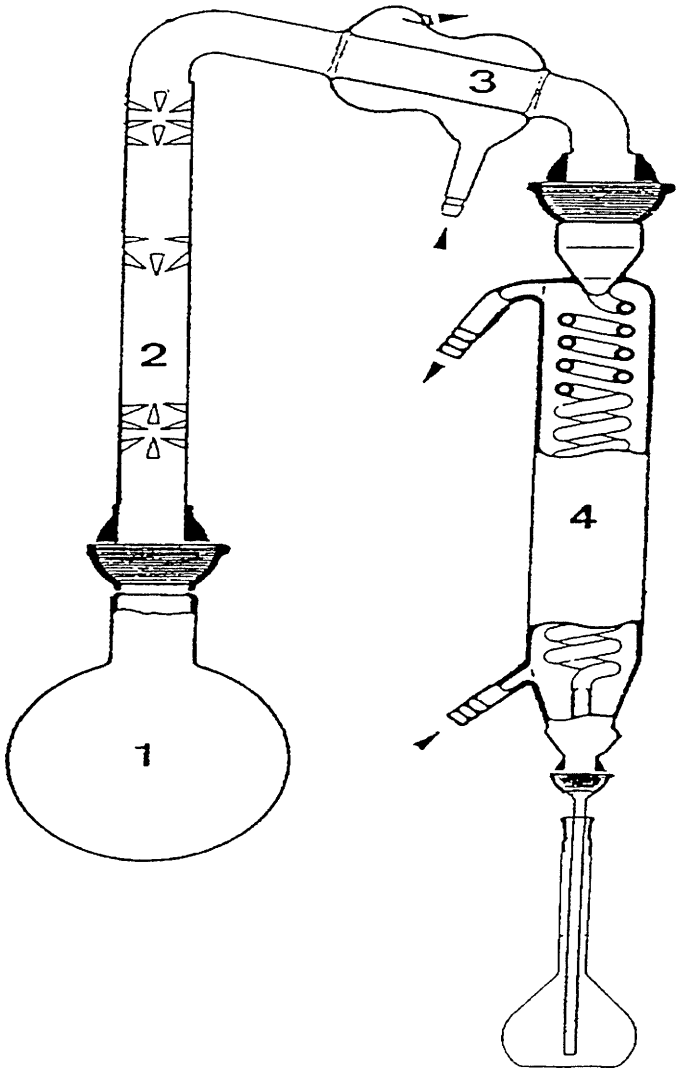
| Prøve | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 12 | 10 | 11 | 12 | 11 | 9 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | — | 2 | 1 | — | 1 | 2 |
| Antal accepterede resultater | 24 | 20 | 22 | 24 | 22 | 18 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (% vol.) | 23,80 | 40,09 | 40,29 | 39,26 | 42,38 | 57,16 |
| | 26,51 (*) | | | 43,09 (*) | 45,89 (*) | 63,44 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (% vol.) | 0,048 | 0,065 | 0,042 | 0,099 | 0,094 | 0,106 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 0,19 | 0,16 | 0,10 | 0,24 | 0,21 | 0,18 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (% vol.) | 0,13 | 0,18 | 0,12 | 0,28 | 0,26 | 0,30 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (% vol.) | 0,060 | 0,076 | 0,073 | 0,118 | 0,103 | 0,125 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 0,24 | 0,19 | 0,18 | 0,29 | 0,23 | 0,21 |

▼B

| Prøve | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (% vol.) | 0,17 | 0,21 | 0,20 | 0,33 | 0,29 | 0,35 |

Prøvetyper:
A frugtlikør; to niveauer (*)
B brandy; blind dobbeltbestemmelse
C whisky; blind dobbeltbestemmelse
D grappa; to niveauer (*)
E aquavit; to niveauer (*)
F rum; to niveauer (*).

▼B




Figur 1: Destillationsapparat til bestemmelse af faktisk volumenkoncentration af alkohol af spiritus

1. 1 liter rundbundet kolbe med standardslib
2. 20 cm lang destillationskolonne (f.eks. Vigreux-kolonne)
3. 10 cm lang glat svaler (f.eks. West-svaler)
4. kølespiral, 40 cm lang.

▼B

## II. METODE TIL BESTEMMELSE AF TOTALT TØRSTOFINDHOLD — GRAVIMETRISK METODE

### 1. Anvendelsesområde

Ifølge forordning (EØF) nr. 1576/89 anvendes denne metode kun til akvavit med et tørstofindhold på højst 15 g/l.

### 2. Normative referencer

ISO 3696:1987: Vand til analytisk laboratoriebrug. Specifikation og prøvningsmetoder.

### 3. Definition

Det totale tørstofindhold er mængden af de stoffer, som ved givne fysiske betingelser ikke forflygtiges.

### 4. Princip

Vejning af spiritussens inddampningsrest efter inddampning på kogende vandbad og tørring i tørreovn.

### 5. Apparatur og udstyr

5.1. Fladbundet cylinderformet inddampningsskål med diameter 55 mm.

5.2. Kogende vandbad.

5.3. 25 ml pipette, klasse A.

5.4. Tørreovn.

5.5. Ekssikkator.

5.6. Analysevægt med nøjagtighed 0,1 mg.

### 6. Prøveudtagning og prøver

Prøver opbevares ved rumtemperatur inden analysen.

### 7. Fremgangsmåde

7.1. Der afpipetteres 25 ml spiritus med under 15 g tørstof pr. liter i en allerede vejet fladbundet cylindrisk inddampningsskål med en diameter på 55 mm. I den første time anbringes inddampningsskålen på låget af et kogende vandbad, så væsken ikke koger, hvilket kunne medføre tab ved sprøjt. Derefter henstår skålen i endnu en time direkte over dampen fra det kogende vandbad.

7.2. Tørringen afsluttes med, at skålen sættes i tørreovn ved 105 ± 3 ºC i 2 timer. Skålen afkøles i ekssikkator og vejes med indhold.

### 8. Beregning

Remanensens masse multipliceret med 40 er spiritussens tørstofindhold i g/l. Det opgives med en decimal.

### 9. Metodens kvalitetsparametre (præcision)

9.1. Statistiske resultater af interkalibrering

Følgende data kommer fra en international metodekvalitetsundersøgelse, der er foretaget efter internationalt anerkendte procedurer [1] [2].

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 10 |
| Antal prøver: | 4. |

▼B

| Prøve | A | B | C | D |
|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimine-ring af laboratorier med afvigende resultater | 9 | 9 | 8 | 9 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 1 | 1 | 2 | — |
| Antal accepterede resultater | 18 | 18 | 16 | 18 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (g/l) | 9,0 | 9,1 | 10,0 | 11,8 |
| | | 7,8 | 9,4 | 11,1 |
| Standardafvigelse for repeter-barhed ($s_r$) (g/l) | 0,075 | 0,441 | 0,028 | 0,123 |
| Relativ standardafvigelse for repe-terbarhed ($RSD_r$) (%) | 0,8 | 5,2 | 0,3 | 1,1 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (g/l) | 0,2 | 1,2 | 0,1 | 0,3 |
| Standardafvigelse for reproducer-barhed ($s_R$) (g/l) | 0,148 | 0,451 | 0,058 | 0,210 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 1,6 | 5,3 | 0,6 | 1,8 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (g/l) | 0,4 | 1,3 | 0,2 | 0,6 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B rom; to niveauer
C grappa; to niveauer
D akvavit; to niveauer.

▼B

## III. BESTEMMELSE AF FLYGTIGE STOFFER I SPIRITUS

### III.1. GENERELLE BEMÆRKNINGER

1. **Definitioner**

I forordning (EØF) nr. 1576/89 er der fastsat minimumsgrænser for indholdet af andre flygtige stoffer end ethanol og methanol i en række spiritusser (rom, vinbrændevin, frugtbrændevin mv.). For sådanne drikkevarer anses dette indhold pr. konvention at svare til summen af koncentrationerne af følgende:

1) flygtige syrer udtrykt som eddikesyre
2) aldehyder udtrykt som ethanal i form af summen af ethanal (acetaldehyd) og ethanalandelen af 1,1-diethoxyethan (acetal)
3) følgende højere alkoholer: propan-1-ol, butan-1-ol, butan-2-ol og 2-methylpropan-1-ol, bestemt hver for sig, samt 2-methylbutan-1-ol og 3-methylbutan-1-ol bestemt hver for sig eller som summen af de to
4) ethylacetat.

Til bestemmelse af flygtige forbindelser benyttes følgende metoder pr. konvention:

— flygtige syrer bestemmes som sådanne
— aldehyder (ethanal og acetal), ethylacetat og alkoholer ved gaskromatografi (GLC).

2. **Gaskromatografisk analyse af flygtige forbindelser**

Gaskromatografisk analyse af andre flygtige forbindelser end de ovenfor nævnte kan vise sig særlig interessant til at bestemme både oprindelsen af de råvarer, der er benyttet til destillationen, og de herskende destillationsbetingelser.

Nogle spirituosa indeholder andre flygtige komponenter, f.eks. aromatiske forbindelser, som er karakteristiske for de råvarer, der er benyttet til fremstilling af alkoholen, for spiritussens aroma og for den særlige måde, spiritussen er fremstillet på. Sådanne forbindelser er af stor betydning for evaluering af, om kravene i forordning (EØF) nr. 1576/89 er opfyldt.

### III.2. GASKROMATOGRAFISK BESTEMMELSE AF FLYGTIGE BESLÆGTEDE STOFFER I SPIRITUS

1. **Anvendelsesområde**

Metoden er egnet til bestemmelse af 1,1-diethoxyethan (acetal), 2-methylbutan-1-ol (optisk aktiv amylalkohol), 3-methylbutan-1-ol (isoamylalkohol), methanol (methylalkohol), ethylethanoat (ethylacetat), butan-1-ol (n-butanol), butan-2-ol (sec-butanol), 2-methylpropan-1-ol (isobutylalkohol), propan-1-ol (n-propanol) og ethanal (acetaldehyd) i spiritus ved gaskromatografi. Metoden benytter intern standard, f.eks. pentan-3-ol. Analysandkoncentrationerne udtrykkes i gram pr. 100 liter absolut alkohol; produktets alkoholkoncentration må bestemmes inden analysen. Blandt de spirituosa, der kan analyseres ved denne metode, er whisky, brandy, rom, vinbrændevin, frugtbrændevin og brændevin af presserester af druer.

2. **Normative referencer**

ISO 3696:1987: Vand til analytisk laboratoriebrug. Specifikation og prøvningsmetoder.

3. **Definition**

Beslægtede stoffer er flygtige stoffer, der dannes sammen med ethanol under fermentering, destillation og ældning af spiritus.

4. **Princip**

Beslægtede stoffer i spiritus bestemmes ved direkte indsprøjtning af spiritussen eller en passende fortyndet spiritus i et gaskromatografsystem. Inden indsprøjtningen tilsættes der en passende intern standard til spiritussen. De forskellige beslægtede stoffer adskilles ved temperaturprogrammering med en passende kolonne, og de påvises med flammeioniseringsdetektor (FID). Koncentrationen af det enkelte

▼B

beslægtede stof bestemmes ud fra den interne standard på grundlag af responsfaktorer, som bestemmes under kalibrering ved samme kromatograferingsbetingelser som ved analyse af spiritussen.

5. **Reagenser og materialer**

Medmindre andet er anført, må der kun benyttes reagenser med en renhed på mindst 97 %, som er indkøbt hos en ISO-akkrediteret leverandør med renhedscertifikat, og som ikke indeholder andre beslægtede stoffer ved testfortyndingen (dette kan bekræftes ved indsprøjtning af standarder for de enkelte beslægtede stoffer ved testfortyndingen under kromatograferingsbetingelser som i punkt 6.4), og kun vand af mindst klasse 3 if. ISO 3696:1987. Acetal og acetaldehyd skal opbevares mørkt ved < 5 ºC, mens alle andre reagenser kan opbevares ved rumtemperatur.

5.1. Ethanol, absolut (CAS 64-17-5).

5.2. Methanol (CAS 67-56-1).

5.3. Propan-1-ol (CAS 71-23-8).

5.4. 2-methylpropan-1-ol (CAS 78-33-1).

5.5. Som intern standard accepteres følgende: pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-methylpentan-1-ol (CAS 626-89-1) og methylnonanoat (CAS 1731-84-6).

5.6. 2-methylbutan-1-ol (CAS 137-32-6).

5.7. 3-methylbutan-1-ol (CAS 123-51-3).

5.8. Ethylacetat (CAS 141-78-6).

5.9. Butan-1-ol (CAS 71-36-3).

5.10. Butan-2-ol (CAS 78-92-2).

5.11. Acetaldehyd (CAS 75-07-0).

5.12. Acetal (CAS 105-57-7).

5.13. 40 % v/v ethanolopløsning

Fremstilles ved at hælde 400 ml ethanol (5.1) i en 1 liter målekolbe, fylde op til mærket med destilleret vand og blande.

5.14. Fremstilling og opbevaring af standardopløsninger (fremgangsmåde ved den validerede metode)

Alle standardopløsninger opbevares ved < 5 ºC og fremstilles frisk en gang om måneden. Massen af indgående bestanddele og opløsninger noteres med en nøjagtighed på 0,1 mg.

5.14.1. Standardopløsning — A

Følgende reagenser afpipetteres i en 100 ml målekolbe, der indeholder ca. 60 ml ethanolopløsning (5.13) for at få mindst muligt fordampningstab, hvorefter der fyldes op med ethanolopløsning (5.13) til mærket og blandes omhyggeligt. Man noterer vægten af kolben, hver tilsat komponent og indholdets samlede vægt.

| Komponent | Volumen (ml) |
|---|---|
| methanol (5.2) | 3,0 |
| propan-1-ol (5.3) | 3,0 |
| 2-methylpropan-1-ol (5.4) | 3,0 |
| 2-methylbutan-1-ol (5.6) | 3,0 |
| 3-methylbutan-1-ol (5.7) | 3,0 |
| ethylacetat (5.8) | 3,0 |
| butan-1-ol (5.9) | 3,0 |
| butan-2-ol (5.10) | 3,0 |
| acetaldehyd (5.11) | 3,0 |
| acetal (5.12) | 3,0 |

Anm. 1: Det foretrækkes af hensyn til det mindst mulige fordampningstab at tilsætte acetal og acetaldehyd til sidst.

▼B

5.14.2. Standardopløsning — B

Der afpipetteres 3 ml pentan-3-ol eller en anden egnet intern standard (5.5) i en 100 ml målekolbe, der indeholder ca. 80 ml ethanolopløsning (5.13), hvorefter der fyldes op til mærket med ethanolopløsning (5.13) og blandes omhyggeligt.

Man noterer vægten af kolben, den tilsatte pentan-3-ol eller anden intern standard og indholdets samlede vægt.

5.14.3. Standardopløsning — C

Der afpipetteres 1 ml opløsning A (5.14.1) og 1 ml opløsning B (5.14.2) i en 100 ml målekolbe, der indeholder ca. 80 ml ethanolopløsning (5.13), hvorefter der fyldes op til mærket med ethanolopløsning (5.13) og blandes omhyggeligt.

Man noterer vægten af kolben, hver tilsat komponent og indholdets samlede vægt.

5.14.4. Standardopløsning — D

For at bevare kontinuitet i analyserne fremstilles der en kvalitetskontrolstandard ud fra den tidligere fremstillede standard A (5.14.1). Der afpipetteres 1 ml opløsning A (5.14.1) i en 100 ml målekolbe, der indeholder ca. 80 ml ethanolopløsning (5.13), hvorefter der fyldes op til mærket med ethanolopløsning (5.13) og blandes omhyggeligt.

Man noterer vægten af kolben, hver tilsat komponent og indholdets samlede vægt.

5.14.5. Standardopløsning — E

Der afpipetteres 10 ml opløsning B (5.14.2) i en 100 ml målekolbe, der indeholder ca. 80 ml ethanolopløsning (5.13), hvorefter der fyldes op til mærket med ethanolopløsning (5.13) og blandes omhyggeligt.

Man noterer vægten af kolben, hver tilsat komponent og indholdets samlede vægt.

5.14.6. Standardopløsninger til kontrol af lineariteten af FID-detektorens respons

Der afpipetteres 0, 0,1, 0,5, 1,0 og 2,0 ml opløsning A (5.14.1) i hver sin 100 ml målekolbe, der indeholder ca. 80 ml ethanolopløsning (5.13), hvorefter der tilsættes 1 ml opløsning B (5.14.2), fyldes op til mærket med ethanolopløsning (5.13) og blandes omhyggeligt.

Man noterer vægten af kolben, hver tilsat komponent og indholdets samlede vægt.

5.14.7. Standardopløsning til kvalitetskontrol (QC-standard)

Der afpipetteres 9 ml standardopløsning D (5.14.4) og 1 ml standardopløsning E (5.14.5) i et vejeglas, og der blandes omhyggeligt.

Man noterer vægten af kolben, hver tilsat komponent og indholdets samlede vægt.

6. **Apparatur og udstyr**

6.1. Apparatur til måling af densitet og alkoholkoncentration.

6.2. Analysevægt til måling med fire decimaler.

6.3. Gaskromatograf med temperaturprogrammering, flammeioniseringsdetektor og integrator eller andet databehandlingssystem til måling af toparealer eller tophøjder.

6.4. Gaskromatografikolonne(r), der kan adskille analysanderne, således at opløsningen af de enkelte komponenter (undtagen 2-methylbutan-1-ol og 3-methylbutan-1-ol) er mindst 1,3.

Anm. 2: Nedennævnte kolonner og GLC-betingelser er eksempler på egnede systemer:

1. Et »retention gap« 1 m × 0,32 mm i.d. forbundet til en CP-WAX 57 CB-kolonne på 50 m × 0,32 mm i.d. og 0,2 µm filmtykkelse (stabiliseret polyethylenglycol) efterfulgt af en Carbowax 400-kolonne på 50 m × 0,32 mm i.d. og 0,2 µm filmtykkelse. (Kolonnerne samles med press-fit-konnektorer.)

Bæregas og -tryk helium (135 kPa)

▼B

| | |
|---|---|
| Kolonnetemperatur: | 35 ºC i 17 min., 35 til 70 ºC med 12 ºC/min., fastholdt ved 70 ºC i 25 min. |
| Injektortemperatur: | 150 ºC |
| Detektortemperatur: | 250 ºC |
| Injektionsvolumen: | 1 µl, split 20 til 100:1. |

2. Et »retention gap« 1 m × 0,32 mm i.d. forbundet til en CP-WAX 57 CB-kolonne på 50 m × 0,32 mm i.d. og 0,2 µm filmtykkelse (stabiliseret polyethylenglycol). (Samles med press-fit-konnektor.)

| | |
|---|---|
| Bæregas og -tryk: | helium (65 kPa) |
| Kolonnetemperatur: | 35 ºC i 10 min., 35 til 110 ºC med 5 ºC/min., 110 til 190 ºC med 30 ºC/min., fastholdt ved 190 ºC i 2 min. |
| Injektortemperatur: | 260 ºC |
| Detektortemperatur: | 300 ºC |
| Injektionsvolumen: | 1 µl, split 55:1. |

3. Pakket kolonne (5 % CW 20M, Carbopak B), 2 m × 2 mm i.d.

| | |
|---|---|
| Kolonnetemperatur: | 65 ºC i 4 min., 65 til 140 ºC med 10 ºC/min., fastholdt ved 140 ºC i 5 min., 140 til 150 ºC med 5 ºC/min., fastholdt ved 150 ºC i 3 min. |
| Injektortemperatur: | 65 ºC |
| Detektortemperatur: | 200 ºC |
| Injektionsvolumen: | 1 µl. |

7. **Prøveudtagning og prøver**

7.1. Laboratorieprøve

Alkoholkoncentrationen af hver prøve måles ved modtagelsen (6.1).

8. **Fremgangsmåde (ved den validerede metode)**

8.1. Prøveportion

8.1.1. Et passende vejeglas med lukning vejes, og massen noteres.

8.1.2. Der afpipetteres 9 ml laboratorieprøve i glasset, og massen noteres ($M_{SAMPLE}$).

8.1.3. Der tilsættes 1 ml standardopløsning E (5.14.5), og massen noteres ($M_{IS}$).

8.1.4. Prøven rystes kraftigt (mindst 20 vendinger). Prøver opbevares ved højst 5 ºC inden analyse, så et eventuelt fordampningstab bliver mindst muligt.

8.2. Blindprøve

8.2.1. Med en firedecimalsvægt (6.2) vejes et passende vejeglas med lukning, og massen noteres.

8.2.2. Der afpipetteres 9 ml 400 ml/l ethanol opløsning (5.13) i glasset, og massen noteres.

8.2.3. Der tilsættes 1 ml standardopløsning E (5.14.5), og massen noteres.

8.2.4. Prøvematerialet rystes kraftigt (mindst 20 vendinger). Prøver opbevares ved højst 5 ºC inden analyse, så et eventuelt fordampningstab bliver mindst muligt.

8.3. Forprøve

Der indsprøjtes standardopløsning C (5.14.3), så det sikres, at alle analysander adskilles med en mindsteopløsning på 1,3 (undtagen 2-methylbutan-1-ol og 3-methylbutan-1-ol).

▼B

8.4. Kalibrering

Kalibreringen kontrolleres på følgende måde. At der er lineært respons kontrolleres ved, at der efter hinanden foretages tredobbelt analyse af hver af linearitetsstandardopløsningerne (5.14.6) indeholdende intern standard (IS). Ud fra integratorens toparealer eller tophøjder ved hver indsprøjtning beregnes forholdet R for hvert beslægtet stof, og R afbildes mod forholdet C mellem koncentrationen af beslægtet stof og intern standard (IS). Punkterne skal danne en ret linje med en korrelationskoefficient på mindst 0,99.

$$R = \frac{\text{topareal eller -højde for beslægtet stof}}{\text{topareal eller -højde for IS}}$$

$$C = \frac{\text{koncentration af beslægtet stof (µg/g)}}{\text{koncentration af IS (µg/g)}}$$

8.5. Bestemmelse

Der indsprøjtes standardopløsning C (5.14.3) og 2 QC-standardopløsninger (5.14.7). Der fortsættes med ukendte prøver (der er tilberedt som beskrevet i 8.1 og 8.2), idet der til sikring af analysestabiliteten indskydes en QC-standardopløsning for hver ti prøver. Der indsprøjtes en standardopløsning C (5.14.3) efter hver femte prøve.

9. **Beregning**

Der kan benyttes et automatisk databehandlingssystem, forudsat at dataene kan kontrolleres efter de nedenfor beskrevne principper.

Topareal eller -højde måles for de beslægtede stoffer og den interne standard.

9.1. Beregning af responsfaktor

Ud fra kromatogrammet fra indsprøjtning af standardopløsning C (5.14.3) beregnes responsfaktoren for hvert beslægtet stof ved hjælp af ligning 1.

$$(1)\ \text{Responsfaktor} = \frac{\text{topareal eller -højde for IS}}{\text{topareal eller -højde for beslægtet stof}} \times \frac{\text{konc. besl. stof (µg/g)}}{\text{konc. IS (µg/g)}}$$

hvor:

IS = intern standard

konc. besl. stof = koncentration af beslægtet stof i opløsning C (5.14.3)

konc. IS = koncentration af intern standard i opløsning C (5.14.3).

9.1.2. Prøveanalyse

Ved hjælp af ligning 2 beregnes koncentrationen af hvert beslægtet stof i prøverne.

$$(2)\ \text{Koncentration af beslægtet stof (µg/g)} = \frac{\text{topareal eller -højde for beslægtet stof}}{\text{topareal eller -højde for IS}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{M_{SAMPLE}\ (g)} \times \text{konc. IS (µg/g)} \times RF$$

hvor:

$M_{SAMPLE}$ = massen af prøven (8.1.2)

$M_{IS}$ = massen af den interne standard (8.1.3)

konc. IS = koncentration af intern standard i opløsning E (5.14.5).

RF = responsfaktoren som beregnet efter ligning 1.

9.1.3. Analyse af kvalitetskontrolstandardopløsning

Ved hjælp af nedenstående ligning 3 beregnes den procentvise genfinding for hvert beslægtet stof i kvalitetskontrolstandarderne

▼B

(5.14.7):

$$(3)\ \%\ \text{genfinding af QC-prøve} = \frac{\text{konc. af analysand i QC-standard}}{\text{konc. af analysand i opløsning D}} \times 100$$

Koncentrationen af analysand i QC-standarden beregnes efter ligning 1 og 2.

9.2. Endelig præsentation af resultaterne

For prøverne omregnes resultaterne fra µg/g til gram pr. 100 liter absolut alkohol ved hjælp af ligning 4:

(4) Koncentration i g pr. 100 l absolut alkohol =

konc. (µg/g) × ρ × 10/(alkoholkonc. (% vol.) × 1 000)

hvor

ρ = densiteten i kg/m³.

Resultaterne anføres med tre betydende cifre og højst én decimal, f.eks. 11,4 g pr. 100 l absolut alkohol.

10. **Kvalitetssikring og kontrol (ved den validerede metode)**

Ved hjælp af ligning 2 beregnes koncentrationen af hvert beslægtet stof i kvalitetskontrolstandardopløsningerne efter fremgangsmåden i 8.1.1-8.1.4. Ved hjælp af ligning 3 beregnes den procentvise genfinding. Er analyseresultaterne inden for ± 10 % af de teoretiske værdier for hvert beslægtet stof, kan analysen fortsættes. I modsat fald undersøges det, hvad årsagen kan være til den manglende nøjagtighed, så der kan træffes de fornødne forholdsregler.

11. **Metodens kvalitetsparametre (præcision)**

Statistiske resultater af interkalibrering: Nedenstående tabel indeholder værdier for følgende stoffer: ethanal, ethylacetat, acetal, totalethanal, methanol, butan-2-ol, propan-1-ol, butan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol.

Følgende data kommer fra en international metodekvalitetsundersøgelse, der er foretaget efter internationalt anerkendte procedurer.

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand: | ethanal. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 28 | 26 | 27 | 27 | 28 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 2 | 4 | 3 | 3 | 2 |
| Antal accepterede resultater | 56 | 52 | 54 | 54 | 56 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 63,4 | 71,67 | 130,4 | 38,4 | 28,6 |
| | | | | 13,8 (*) | 52,2 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 3,3 | 1,9 | 6,8 | 4,1 | 3,6 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 5,2 | 2,6 | 5,2 | 15,8 | 8,9 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 9,3 | 5,3 | 19,1 | 11,6 | 10,1 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 12 | 14 | 22 | 6,8 | 8,9 |

▼B

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 18,9 | 19,4 | 17,1 | 26,2 | 22,2 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 33,5 | 38,9 | 62,4 | 19,1 | 25,1 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
D whisky; to niveauer (*)
E rom; to niveauer (*).

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand: | ethylacetat. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 24 | 24 | 25 | 24 | 24 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| Antal accepterede resultater | 48 | 48 | 50 | 48 | 48 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 96,8 | 1 046 | 120,3 | 112,5<br>91,8 (*) | 99,1<br>117,0 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 2,2 | 15 | 2,6 | 2,1 | 2,6 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 2,3 | 1,4 | 2,1 | 2,0 | 2,4 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 6,2 | 40,7 | 7,2 | 5,8 | 7,3 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 6,4 | 79 | 8,2 | 6,2 | 7,1 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 6,6 | 7,6 | 6,8 | 6,2 | 6,6 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 17,9 | 221,9 | 22,9 | 17,5 | 20,0 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
D whisky; to niveauer (*)
E rom; to niveauer (*).

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand: | acetal. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 20 | 21 | 22 | 17 | 21 |

▼B

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 4 | 3 | 2 | 4 | 3 |
| Antal accepterede resultater | 40 | 42 | 44 | 34 | 42 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 35,04 | 36,46 | 68,5 | 20,36<br>6,60 (*) | 15,1<br>28,3 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 0,58 | 0,84 | 1,6 | 0,82 | 1,9 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 1,7 | 2,3 | 2,3 | 6,1 | 8,7 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 1,6 | 2,4 | 4,4 | 2,3 | 5,3 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 4,2 | 4,4 | 8,9 | 1,4 | 3,1 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 12,1 | 12,0 | 13,0 | 10,7 | 14,2 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 11,8 | 12,2 | 25,0 | 4,0 | 8,7 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
D whisky; to niveauer (*)
E rom; to niveauer (*).

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand: | total ethanal. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 23 | 19 | 22 | 21 | 22 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 1 | 5 | 2 | 3 | 2 |
| Antal accepterede resultater | 46 | 38 | 44 | 42 | 44 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 76,5 | 85,3 | 156,5 | 45,4<br>15,8 (*) | 32,7<br>61,8 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 3,5 | 1,3 | 6,5 | 4,4 | 3,6 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 4,6 | 1,5 | 4,2 | 14,2 | 7,6 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 9,8 | 3,5 | 18,3 | 12,2 | 10,0 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 13 | 15 | 24,1 | 7,3 | 9,0 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 16,4 | 17,5 | 15,4 | 23,7 | 19,1 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 35,2 | 41,8 | 67,4 | 20,3 | 25,2 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
D whisky; to niveauer (*)
E rom; to niveauer (*).

▼B

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand | methanol. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimine-ring af laboratorier med afvigende resultater | 26 | 27 | 27 | 28 | 25 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 4 | 3 | 3 | 1 | 4 |
| Antal accepterede resultater | 52 | 54 | 54 | 56 | 50 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 319,8 | 2 245 | 1 326 | 83,0<br>61,5 (*) | 18,6<br>28,9 (*) |
| Standardafvigelse for repeter-barhed ($s_r$) (µg/g) | 4,4 | 27 | 22 | 1,5 | 1,3 |
| Relativ standardafvigelse for repe-terbarhed ($RSD_r$) (%) | 1,4 | 1,2 | 1,7 | 2,1 | 5,6 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 12,3 | 74,4 | 62,5 | 4,3 | 3,8 |
| Standardafvigelse for reproducer-barhed ($s_R$) (µg/g) | 13 | 99 | 60 | 4,5 | 2,8 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 3,9 | 4,4 | 4,6 | 6,2 | 11,8 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 35,2 | 278,3 | 169,1 | 12,5 | 7,9 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemelse
D whisky; to niveauer (*).
E rom; to niveauer (*).

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 4 |
| Analysand | butan-2-ol. |

| Prøve | A | B | C | E |
|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimine-ring af laboratorier med afvigende resultater | 21 | 27 | 29 | 22 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 4 | 3 | 1 | 3 |
| Antal accepterede resultater | 42 | 54 | 58 | 44 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 5,88 | 250,2 | 27,57 | 5,83<br>14,12 (*) |
| Standardafvigelse for repeter-barhed ($s_r$) (µg/g) | 0,40 | 2,2 | 0,87 | 0,64 |
| Relativ standardafvigelse for repe-terbarhed ($RSD_r$) (%) | 6,8 | 0,9 | 3,2 | 6,4 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 1,1 | 6,1 | 2,5 | 1,8 |
| Standardafvigelse for reproducer-barhed ($s_R$) (µg/g) | 0,89 | 13 | 3,2 | 0,87 |

▼B

| Prøve | A | B | C | E |
|---|---|---|---|---|
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 15,2 | 5,1 | 11,5 | 8,7 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 2,5 | 35,5 | 8,9 | 2,4 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
E rom; to niveauer (*).

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand: | propan-1-ol. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 29 | 27 | 27 | 29 | 29 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 2 | 4 | 3 | 2 | 2 |
| Antal accepterede resultater | 58 | 54 | 54 | 58 | 58 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 86,4 | 3 541 | 159,1 | 272,1<br>229,3 (*) | 177,1<br>222,1 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 3,0 | 24 | 3,6 | 2,3 | 3,3 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 3,4 | 0,7 | 2,3 | 0,9 | 1,6 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 8,3 | 68,5 | 10,0 | 6,4 | 9,1 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 5,3 | 150 | 6,5 | 9,0 | 8,1 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 6,1 | 4,1 | 4,1 | 3,6 | 4,1 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 14,8 | 407,2 | 18,2 | 25,2 | 22,7 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltmasse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
D whisky; to niveauer (*)
E rom; to niveauer (*).

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand: | butan-1-ol. |

| Prøve | A | B | C |
|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 20 | 22 | 22 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 4 | 4 | 6 |

▼B

| Prøve | A | B | C |
|---|---|---|---|
| Antal accepterede resultater | 40 | 44 | 44 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 3,79 | 5,57 | 7,54 |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 0,43 | 0,20 | 0,43 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 11,2 | 3,6 | 5,6 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 1,1 | 0,6 | 1,2 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 0,59 | 0,55 | 0,82 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 15,7 | 9,8 | 10,8 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 1,7 | 1,5 | 2,3 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse.

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand | 2-methylpropan-1-ol. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 28 | 31 | 30 | 26 | 25 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 3 | 0 | 1 | 5 | 6 |
| Antal accepterede resultater | 56 | 62 | 60 | 52 | 50 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 174,2 | 111,7 | 185,0 | 291,0<br>246,8 (*) | 115,99<br>133,87 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 2,3 | 1,6 | 2,5 | 1,8 | 0,74 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 1,3 | 1,4 | 1,3 | 0,7 | 0,6 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 6,4 | 4,5 | 6,9 | 5,0 | 2,1 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 8,9 | 8,9 | 9,7 | 6,0 | 6,2 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 5,1 | 8,0 | 5,2 | 2,2 | 5,0 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 24,9 | 24,9 | 27,2 | 16,9 | 17,4 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
D whisky; to niveauer (*)
E rom; to niveauer (*).

▼B

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand: | 2-methyl-butan-1-ol. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 25 | 26 | 25 | 27 | 25 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 3 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| Antal accepterede resultater | 50 | 52 | 50 | 54 | 50 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 113,0 | 48,3 | 91,6 | 72,1<br>45,2 (*) | 39,5<br>61,5 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 2,1 | 1,5 | 1,7 | 2,3 | 2,3 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 1,9 | 3,1 | 1,8 | 3,9 | 4,5 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 6,0 | 4,2 | 4,7 | 6,4 | 6,3 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 7,4 | 3,8 | 6,6 | 4,7 | 4,5 |
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 6,6 | 7,9 | 7,2 | 8,1 | 8,8 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 20,8 | 10,7 | 18,4 | 13,3 | 12,5 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
D whisky; to niveauer (*)
E rom; to niveauer (*).

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1997 |
| Antal laboratorier: | 32 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand | 3-methyl-butan-1-ol. |

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 23 | 23 | 24 | 27 | 21 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 5 | 5 | 4 | 1 | 6 |
| Antal accepterede resultater | 46 | 46 | 48 | 54 | 42 |
| Gennemsnit ($\bar{x}$) (µg/g) | 459,4 | 242,7 | 288,4 | 142,2<br>120,4 (*) | 212,3<br>245,6 (*) |
| Standardafvigelse for repeterbarhed ($s_r$) (µg/g) | 5,0 | 2,4 | 3,4 | 2,4 | 3,2 |
| Relativ standardafvigelse for repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,8 | 1,4 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (µg/g) | 13,9 | 6,6 | 9,6 | 6,6 | 9,1 |
| Standardafvigelse for reproducerbarhed ($s_R$) (µg/g) | 29,8 | 13 | 21 | 8,5 | 6,7 |

▼B

| Prøve | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 6,5 | 5,2 | 7,3 | 6,5 | 2,9 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (µg/g) | 83,4 | 35,4 | 58,8 | 23,8 | 18,7 |

Prøvetyper:
A brandy; blind dobbeltbestemmelse
B kirsch; blind dobbeltbestemmelse
C grappa; blind dobbeltbestemmelse
D whisky; to niveauer (*)
E rom; to niveauer (*).

▼M1

## V. ANETHOL. GASKROMATOGRAFISK BESTEMMELSE AF TRANS-ANETHOL I SPIRITUS

1. **Anvendelsesområde**

Metoden er egnet til bestemmelse af trans-anethol i spiritus med anissmag ved kapillargaskromatografi.

2. **Normative referencer**

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods.

3. **Princip**

Spiritussens koncentration af trans-anethol bestemmes ved gaskromatografi (GC). Der tilsættes ens mængde intern standard, f.eks. 4-allylanisol (estragol), når estragol ikke er naturligt til stede i prøven, til prøven og til en trans-anethol-referenceopløsning med kendt koncentration, hvorefter begge opløsninger fortyndes med en 45 % ethanolopløsning og injiceres direkte i gaskromatografisystemet. Ekstrahering er nødvendig, før prøver af likører, der indeholder store mængder sukker, fremstilles og analyseres.

4. **Reagenser og materialer**

Under analysen må der kun anvendes reagenser med en renhed på mindst 98 %. Vand af mindst klasse 3 if. ISO 3696 anvendes.

Referencekemikalier skal opbevares koldt (ca. 4 ºC), beskyttet mod lys i aluminiumbeholdere eller i reagensflasker af farvet (ravgult) glas. Propperne skal helst være forsynet med aluminiumpakning. Trans-anethol skal før brug »optøs« fra sin krystallinske tilstand, men herunder må dets temperatur ikke komme over 35 ºC.

4.1. Ethanol 96 % v/v (CAS 64-17-5).

4.2. 1-methoxy-4-(1-propenyl)benzen (trans-anethol) (CAS 4180-23-8).

4.3. 4-allylanisol (estragol) (CAS 140-67-0), foreslået intern standard (IS).

4.4. Ethanol 45 % v/v.

Til 560 g destilleret vand tilsættes 378 g ethanol 96 % v/v.

4.5. Fremstilling af standardopløsninger

Alle standardopløsninger skal opbevares ved rumtemperatur (15-35 ºC), beskyttet mod lys i aluminiumbeholdere eller i reagensflasker af farvet (ravgult) glas. Propperne skal helst have aluminiumtætning.

Trans-anethol og 4-allylanisol er praktisk talt uopløselige i vand og må derfor opløses i noget 96 % ethanol (4.1), før der tilsættes 45 % ethanol (4.4).

Nye stamopløsninger skal fremstilles hver uge.

4.5.1. Standardopløsning A

Stamopløsning af trans-anethol (koncentration: 2 g/l).

40 mg trans-anethol (4.2) afvejes i en 20 ml målekolbe (eller 400 mg i 200 ml osv.). Der tilsættes noget 96 % ethanol (4.1) og fyldes op til stregen med 45 % v/v ethanol (4.4), hvorefter der blandes grundigt.

4.5.2. Intern standardopløsning B

Stamopløsning af intern standard, f.eks. estragol (koncentration: 2 g/l).

40 mg estragol (4.3) afvejes i en 20 ml målekolbe (eller 400 mg i 200 ml osv.). Der tilsættes noget 96 % ethanol (4.1) og fyldes op til stregen med 45 % v/v ethanol (4.4), hvorefter der blandes grundigt.

4.5.3. Opløsninger til kontrol af lineariteten af flammeiondetektorens respons

Lineariteten af flammeiondetektorens respons skal kontrolleres med henblik på analyse under hensyntagen til en række koncentrationer af trans-anethol i spiritus fra 0 til 2,5 g/l. Under analysen fortyndes de ukendte spiritusprøver, der skal analyseres, ti gange (8.3). Med henblik på de i metoden beskrevne analysebetingelser fremstilles der stamopløsninger svarende til koncentrationer på 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2

▼M1

og 0,25 g/l trans-anethol i den prøve, der skal analyseres, som følger: 0,5, 1, 1,5, 2 og 2,5 ml stamopløsning A (4.5.1) afpipetteres i hver sin 20 ml målekolbe. I hver målekolbe afpipetteres 2 ml intern standardopløsning B (4.5.2), hvorefter der fyldes op til stregen med 45 % v/v ethanol (4.4) og blandes grundigt.

Blankopløsninger (8.4) anvendes som 0 g/l-opløsning.

4.5.4. Standardopløsning C

I en 20 ml målekolbe afpipetteres 2 ml stamopløsning A (4.5.1); der tilsættes 2 ml intern standardopløsning B (4.5.2) og fyldes op til stregen med 45 % v/v ethanol (4.4), hvorefter der blandes grundigt.

5. **Apparatur og udstyr**

5.1. Kapillargaskromatograf med flammeiondetektor og integrator eller andet databehandlingssystem, som kan måle toparealer eller tophøjder, og med automatisk prøveudtager eller med det nødvendige udstyr til manuel injektion af prøve.

5.2. Injektor med/uden split.

5.3. Kapillarsøjle, f.eks.:

længde: 50 m

indvendig diameter: 0,32 mm

filmtykkelse: 0,2 µm

stationær fase: FFAP — modificeret tværbunden porøs TPA-polyethylenglycol-polymer.

5.4. Sædvanligt laboratorieudstyr: volumetrisk glasudstyr af klasse A, analysevægt (nøjagtighed: ± 0,1 mg).

6. **Betingelser for kromatografi**

Kolonnens type og dimensioner samt betingelserne for gaskromatografi skal vælges således, at anethol og intern standard er adskilt fra hinanden og fra alle forstyrrende stoffer. Typiske betingelser for den i punkt 5.3 som eksempel angivne kolonne er:

6.1. Bæregas: helium af analysekvalitet.

6.2. Flowhastighed: 2 ml/min.

6.3. Injektortemperatur: 250 ºC.

6.4. Detektortemperatur: 250 ºC.

6.5. Ovntemperatur: isotermisk, 180 ºC, køretid 10 min.

6.6. Injektionsvolumen: 1 µl, opdeling 1:40.

7. **Prøver**

Prøver skal opbevares ved rumtemperatur, beskyttet mod lys- og kuldepåvirkning.

8. **Fremgangsmåde**

8.1. Screening af prøverne for estragol

For at sikre, at prøven ikke i forvejen indeholder estragol, analyseres en blankprøve uden tilsætning af intern standard. Hvis estragol forekommer naturligt, må der vælges en anden intern standard (f.eks. menthol).

2 ml stamopløsning A afpipetteres i en 20 ml målekolbe, der fyldes op til stregen med 45 % v/v ethanol (4.4) og blandes grundigt.

8.2. Tilberedning af ukendte prøver

I en 20 ml målekolbe afpipetteres 2 ml prøve; der tilsættes 2 ml intern standardopløsning B (4.5.2) og fyldes op til stregen med 45 % v/v ethanol (4.4), hvorefter der blandes grundigt.

8.3. Blankprøve

I en 20 ml målekolbe afpipetteres 2 ml intern standardopløsning B (4.5.2), og der fyldes op til stregen med 45 % v/v ethanol (4.4), hvorefter der blandes grundigt.

▼M1

8.4. Linearitetsprøve

Før analysen påbegyndes, kontrolleres lineariteten af flammeiondetektorens respons ved tre på hinanden følgende bestemmelser af hver linearitetsstandardopløsning (4.5.3).

Af integratorens topareal eller tophøjde afsættes for hver injektion koncentrationen af den tilsvarende stamopløsning i g/l mod forholdet R.

R = trans-anethol tophøjde eller -areal, divideret med estragol tophøjde eller -areal.

Derved skal fremkomme en retlinjet kurve.

8.5. Bestemmelse

Injicer blankopløsningen (8.3) efterfulgt af standardopløsning C (4.5.4), efterfulgt af en af linearitetsstandarderne (4.5.3), der fungerer som kvalitetskontrolprøve (denne kan vælges på grundlag af den formodede koncentration af trans-anethol i den ukendte prøve), efterfulgt af fem ukendte (8.2). Efter hver fem ukendte prøver indskydes en linearitetsprøve (kvalitetskontrolprøve) for at sikre den analytiske stabilitet.

9. **Beregning af responsfaktor**

Der måles enten topareal (med integrator eller andet datasystem) eller tophøjde (ved manuel integration) for trans-anethol og intern standard.

9.1. Beregning af responsfaktor ($RF_i$)

Responsfaktoren beregnes således:

RFi = (Ci/topareal eller -højdei ) * (topareal eller -højdeis/Cis)

hvor:

$C_i$ er koncentrationen af trans-anethol i standardopløsning A (4.5.1)

$C_{is}$ er koncentrationen af intern standard i standardopløsning B (4.5.2)

$areal_i$ er areal (eller højde) af trans-anethol-toppen

$areal_{is}$ er areal (eller højde) af intern standard-toppen.

$RF_i$ beregnes af de fem prøver af opløsning C (4.5.4).

9.2. Analyse af opløsningerne til linearitetskontrol

Injicer opløsningerne til linearitetskontrol (4.5.3).

9.3. Analyse af prøver

Injicer opløsningen af den ukendte prøve (8.2).

10. **Beregning af resultaterne**

Koncentrationen af trans-anethol beregnes ved følgende formel:

ci = Cis * (topareal eller -højdei/topareal eller -højdeis) * RFi

hvor:

$c_i$ er den ukendte koncentration af trans-anethol

$C_{is}$ er koncentrationen af intern standard i den ukendte prøve (4.5.2)

topareal eller -$højde_i$ er trans-anethol toppens areal (eller højde)

topareal eller -$højde_{is}$ er areal (eller højde) af toppen for intern standard

$RF_i$ er responskoefficienten (beregnet som angivet i punkt 9.1).

Koncentrationen af trans-anethol angives i gram pr. liter med én decimal.

11. **Kvalitetssikring og -kontrol**

Kromatogrammerne skal være sådan, at anethol og intern standard er adskilt fra hinanden og fra ethvert forstyrrende stof. $RF_i$-værdien beregnes af resultaterne af de fem injektioner af opløsning C (4.5.4).

▼M1

Hvis variationskoefficienten (CV % = (standardafvigelse/gennemsnit) * 100)) er inden for plus eller minus 1 %, er $RF_i$-gennemsnitsværdien acceptabel.

Ovenstående beregning skal anvendes til beregning af koncentrationen af trans-anethol i den prøve, der er udvalgt til kvalitetskontrol fra linearitetskontroloplø sningerne (4.5.3).

Hvis de beregnede gennemsnitsresultater af analysen af den linearitetsopløsning, der er valgt som intern kvalitetskontrolprøve (IQC), er inden for plus eller minus 2,5 % fra den teoretiske værdi, kan resultaterne for de ukendte prøver godtages.

12. **Behandling af prøve af spiritus med stort indhold af sukker og likør før GC-analyse**

Ekstraktion af alkohol i spiritus med stort sukkerindhold med henblik på bestemmelse af koncentrationen af trans-anethol med kapillargaskromatografi.

12.1. PRINCIP

Af prøven af likør udtages en alikvot del, hvortil der tilsættes intern standard i en koncentration svarende til analysandens (trans-anethol) i likøren. Dette tilsættes natriumphosphat (dodecahydrat) og vandfrit ammoniumsulphat. Den resulterende blanding rystes godt og afkøles, hvorved den deler sig i to lag. Den øverste, alkoholiske fase dekanteres. En alikvot del af denne alkoholfase udtages og fortyndes med 45 % ethanolopløsning (4.4). (Bemærkning: Der tilsættes ikke intern standard på dette trin, da den er tilsat i forvejen). Den resulterende opløsning analyseres ved gaskromatografi.

12.2. REAGENSER OG MATERIALER

Til ekstraktionen må kun anvendes reagenser med renhed på over 99 %.

12.2.1. Ammoniumsulphat, vandfrit (CAS 7783-20-2).

12.2.2. Natriumphosphat, dibasisk, dodecahydrat (CAS 10039-32-4).

12.3. APPARATUR OG UDSTYR

Koniske kolber, skilletragte, køleskab.

12.4. FREMGANGSMÅDE

12.4.1. Screening af prøverne for estragol

For at sikre, at der ikke i forvejen findes estragol i prøven, undersøges en blank ekstraktion (12.6.2), og analysen finder sted uden tilsætning af intern standard. Hvis estragol forekommer naturligt, må der vælges en anden intern standard.

12.4.2. Ekstraktion

I en konisk kolbe afpipetteres 5 ml 96 % ethanol (4.1), og i samme kolbe afvejes 50 mg intern standard (4.3), og der tilsættes 50 ml af prøven. Der tilsættes 12 g ammonium sulfat, vandfrit (12.2.1), samt 8,6 g dibasisk natriumphosphat, dodecahydrat (12.2.2). Den koniske kolbe tilproppes.

Kolben omrystes i mindst 30 minutter. Der skal anvendes mekanisk rystebord, ikke en teflonbelagt omrører, da teflon vil absorbere noget af analysanden. Bemærk, at de tilsatte salte ikke vil blive fuldstændig opløst.

Den tilproppede kolbe stilles i køleskab ($T < 5\ ^{o}C$) i mindst to timer.

Når denne tid er gået, skal der have dannet sig to tydeligt adskilte væskelag og et bundfald. Det alkoholiske lag skal være klart. Hvis ikke, sættes kolben tilbage i køleskabet, indtil der er opnået et klart adskilt lag.

Når det alkoholiske lag er klart, udtager man uden at forstyrre den vandige fase forsigtigt en alikvot mængde (f.eks. 10 ml), som overføres til et ravgult hætteglas, der lukkes forsvarligt.

12.4.3. Fremstilling af den ekstraherede prøve til analyse

Lad ekstrakten (12.4.2) nå rumtemperatur.

I en 20 ml målekolbe afpipetteres 2 ml af alkoholfasen af den afkølede ekstraherede prøve, og der fyldes op til stregen med 45 % v/v ethanol (4.4), hvorefter der blandes grundigt.

▼M1

12.5. Bestemmelse

Følg proceduren i punkt 8.5.

12.6. Beregning af resultaterne

Til beregning af resultaterne anvendes følgende formel:

Ci = (mis/V) * (areali/arealis) *RFi

hvor:

$m_{is}$ er massen af den udtagne (12.4.2) interne standard (4.3) (mg)

V er rumfanget af ukendt prøve (50 ml)

$RF_i$ er responsfaktoren (9.1)

$areal_i$ er arealet af trans-anethol-toppen

$areal_{is}$ er toparealet af den interne standard.

Resultaterne angives i gram pr. liter med én decimal.

12.7. KVALITETSKONTROL OG KVALITETSSIKRING

Følg proceduren i punkt 11.

13. **Metodens funktionsdata (præcision)**

Statistiske resultater af interkalibrering:

I følgende tabeller er angivet værdier for anethol.

Følgende data er opnået i en international metodekvalitetsundersøgelse, der er udført efter internationalt anerkendte procedurer.

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1998 |
| Antal laboratorier: | 16 |
| Antal prøveemner: | 10 |
| Analysand: | anethol. |

Pastis:

| Prøver | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 15 | 15 | 15 | 13 | 16 | 16 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 1 | 1 | 1 | 3 | — | — |
| Antal accepterede resultater | 30 | 30 | 30 | 26 | 16 | 16 |
| Gennemsnitsværdi g/l | 1,477 | 1,955 | 1,940 | 1,833 | 1,741 | 1,754 |
| Standardafvigelse af repeterbarhed ($S_r$) g/l | 0,022 | 0,033 | 0,034 | 0,017 | — | — |
| Relativ standardafvigelse af repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 1,5 | 1,7 | 1,8 | 0,9 | — | — |
| Repeterbarhedsgrænse (r) g/l | 0,062 | 0,093 | 0,096 | 0,047 | — | — |
| Standardafvigelse af reproducerbarhed ($S_R$) g/l | 0,034 | 0,045 | 0,063 | 0,037 | 0,058 | 0,042 |
| Relativ standardafvigelse af reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 2,3 | 2,3 | 3,2 | 2,0 | 3,3 | 2,4 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) g/l | 0,094 | 0,125 | 0,176 | 0,103 | 0,163 | 0,119 |

Prøvetyper:

A pastis, blind dobbeltprøve

B pastis, blind dobbeltprøve

C pastis, blind dobbeltprøve

D pastis, blind dobbeltprøve

E pastis, enkeltprøve

▼**M1**

F pastis, enkeltprøve.

Anden spiritus med anissmag:

| Prøver | G | H | I | J |
|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 16 | 14 | 14 | 14 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | — | 2 | 1 | 1 |
| Antal accepterede resultater | 32 | 28 | 28 | 28 |
| Gennemsnitsværdi (g/l) | 0,778<br>0,530 (*) | 1,742 | 0,351 | 0,599 |
| Standardafvigelse af repeterbarhed ($S_r$) (g/l) | 0,020 | 0,012 | 0,013 | 0,014 |
| Relativ standardafvigelse af repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 3,1 | 0,7 | 3,8 | 2,3 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (g/l) | 0,056 | 0,033 | 0,038 | 0,038 |
| Standardafvigelse af reproducerbarhed ($S_R$) (g/l) | 0,031 | 0,029 | 0,021 | 0,030 |
| Relativ standardafvigelse af repeterbarhed ($RSD_R$) (%) | 4,8 | 1,6 | 5,9 | 5,0 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (g/l) | 0,088 | 0,080 | 0,058 | 0,084 |

Prøvetyper:

G ouzo, opdelt niveau (*)

H anis, blind dobbeltprøve

I likør med anissmag, dobbeltprøve

J likør med anissmag, dobbeltprøve

▼M1

## VI. GLYCYRRHIZINSYRE. BESTEMMELSE AF GLYCYRRHIZINSYRE MED HØJPERFORMANS-VÆSKEKROMATOGRAFI

1. **Anvendelsesområde**

Metoden er egnet til bestemmelse af glycyrrhizinsyre i spiritus med anissmag, ved hjælp af højperformans-æskekromatografi (HPLC). I forordning (EØF) nr. 1576/89 er det fastsat, at enhver spiritus, som har anissmag og benævnes »pastis«, skal indeholde mellem 0,05 og 0,5 g glycyrrhizinsyre pr. liter.

2. **Normative referencer**

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods.

3. **Princip**

Koncentrationen af glycyrrhizinsyre bestemmes ved højperformans væskekromatografi (HPLC) med UV-detektion. En standardopløsning og prøven filtreres og injiceres hver for sig direkte i HPLC-systemet.

4. **Reagenser og materialer**

Til analysen må kun benyttes reagenser af HPLC-kvalitet, absolut ethanol og vand af klasse 3 som defineret i ISO 3696.

4.1. Ethanol 96 % v/v (CAS 64-17-5).

4.2. Ammoniumglycyrrhizinat, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (ammoniumsalt af glycyrrhizinsyre)

(molekylvægt 839,98)(CAS 53956-04-0): renhed mindst 90 %

(molekylvægt af glycyrrhizinsyre 822,94).

4.3. Iseddikesyre, $CH_3COOH$ (CAS 64-19-7).

4.4. Methanol, $CH_3OH$ (CAS 67-56-1).

4.5. Ethanol 50 % v/v.

Til 1 000 ml ved 20 ºC:

— 96 % v/v ethanol (4.1): 521 ml
— vand (2.0): 511 ml.

4.6. Fremstilling af HPLC-elueringsvæsker

4.6.1. Elueringsvæske A (eksempel)

80 dele (v/v) vand (2.0)

20 dele (v/v) eddikesyre (4.3).

Elueringsvæsken afgasses i fem minutter.

*Bemærkning:* Er det anvendte vand ikke mikrofiltreret, tilrådes det at filtrere den fremstillede elueringsvæske gennem et filter til organiske opløsningsmidler med porestørrelse på ikke over 0,45 µm.

4.6.2. Elueringsvæske B

Methanol (4.4).

4.7. Fremstilling af standardopløsninger

Alle standardopløsninger skal friskfremstilles efter to måneder.

4.7.1. Referenceopløsning C

25 mg ammoniumglycyrrhizinat (4.2) afvejes til nærmeste 0,1 mg i en 100 ml målekolbe. Der tilsættes noget 50 % v/v ethanol (4.5), og ammoniumglycyrrhizinatet bringes i opløsning. Når det er bragt i opløsning, fyldes op til stregen med 50 % v/v ethanol (4.5).

Opløsningen filtreres gennem et filter til organiske opløsningsmidler.

4.7.2. Standardopløsninger (til kontrol af linearitetet af instrumenternes respons)

Der tilberedes en 1,0 g/l stamopløsning ved afvejning af 100 mg ammoniumglycyrrhizinat til nærmeste 0,1 mg i en 100 ml målekolbe. Der tilsættes noget 50 % v/v ethanol (4.5), og ammoniumglycyrrhizi-

▼M1

natet bringes i opløsning. Når det er bragt i opløsning, fyldes op til stregen med 50 % v/v ethanol (4.5).

Der tilberedes mindst fire andre opløsninger med 0,05, 0,1, 0,25 og 0,5 g ammoniumglycyrrhizinat pr. liter ved at afpipettere henholdsvis 5, 10, 25 og 50 ml af 1,0 g/l-og stamopløsningen i hver sin 100 ml målekolbe. Der fyldes så op til stregen med 50 % v/v ethanol (4.5), og indholdet blandes grundigt.

Alle opløsninger filtreres gennem et filter til organiske opløsningsmidler.

5. **Apparatur og udstyr**

5.1. Adskillelsessystem

5.1.1. Højperformans-væskekromatograf.

5.1.2. Pumpesystem, som giver mulighed for at opnå og opretholde en konstant eller programmeret gennemstrømningshastighed med stor nøjagtighed.

5.1.3. UV-spektrofotometrisk detektionssystem: skal være stillet på 254 nm.

5.1.4. System til afgasning af opløsningsmiddel.

5.2. Dataintegrator eller -registrator med en ydeevne, som er forenelig med det øvrige system.

5.3. Kolonne (eksempel)

Materiale: rustfrit stål eller glas.

Indre diameter: 4-5 mm.

Længde: 100-250 mm.

Stationær fase: tværbundet silica med en (fortrinsvis sfærisk) octadecyl (C18) funktionel gruppe, partikelstørrelse maks. 5 µm.

5.4. Laboratorieudstyr

5.4.1. Analysevægt med en nøjagtighed på 0,1 mg.

5.4.2. Glasmåleudstyr af klasse A.

5.4.3. Mikromembran-filtreringsopstilling til små mængder.

6. **Betingelser for kromatografi**

6.1. Elueringskarakteristika (eksempel)

— gennemstrømningshastighed: 1 ml/minut

— opløsningsvæske A = 30 %

— opløsningsvæske B = 70 %.

6.2. Detektion

— UV = 254 nm.

7. **Fremgangsmåde**

7.1. Fremstilling af spiritusprøven

Om nødvendigt filtreres gennem et filter til organiske opløsningsmidler (porediameter: 0,45 µm).

7.2. Bestemmelse

Når de kromatografiske betingelser har stabiliseret sig:

— Injicer 20 µl af referenceopløsning C (4.7.1).

— Injicer 20 µl af prøveopløsningen.

— De to kromatogrammer sammenholdes. Glycyrrhizinsyre-toppene identificeres ud fra retentionstiden. Mål toppens areal (eller højde) og beregn koncentrationen i g/l med to decimaler ved hjælp af følgende ligning:

$$c = C \times \frac{h \times P \times 823}{H \times 100 \times 840}$$

▼M1

hvor:

c er koncentrationen af glycyrrhizinsyre i den analyserede spiritus (g/l)

C er koncentrationen af ammoniumglycyrrhizinat i referenceopløsningen (g/l)

h er areal (eller højde) af glycyrrhizinsyretoppen for den analyserede spiritus

H er areal (eller højde) af glycyrrhizinsyretoppen for referenceopløsningen

P er renheden af den ammoniumglycyrrhizinat, der anvendes som reference (%)

823 er massen af mol glycyrrhizinsyre

840 er massen af mol ammoniumglycyrrhizinat.

8. **Metodens funktionsdata (præcision)**

Statistiske resultater af interkalibrering:

I følgende tabel er angivet værdier for glycyrrhizinsyre.

Følgende data er opnået i en international metodekvalitetsundersøgelse, der er udført efter internationalt anerkendte procedurer.

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1998 |
| Antal laboratorier: | 16 |
| Antal prøveemner: | 5 |
| Analysand: | glycyrrhizinsyre. |

| Prøver | A | B | C | D | F |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 13 | 14 | 15 | 16 | 16 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 3 | 2 | 1 | — | — |
| Antal accepterede resultater | 26 | 28 | 30 | 32 | 32 |
| Gennemsnitsværdi (g/l) | 0,046 | 0,092<br>(*) 0,099 | 0,089 | 0,249 | 0,493 |
| Standardafvigelse af repeterbarhed ($S_r$) (g/l) | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,003 |
| Relativ standardafvigelse af repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 1,5 | 1,3 | 0,7 | 1,0 | 0,6 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) (g/l) | 0,002 | 0,004 | 0,002 | 0,007 | 0,009 |
| Standardafvigelse af reproducerbarhed ($S_R$) (g/l) | 0,004 | 0,007 | 0,004 | 0,006 | 0,013 |
| Relativ standardafvigelse af reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 8,6 | 7,2 | 4,0 | 2,5 | 2,7 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) (g/l) | 0,011 | 0,019 | 0,010 | 0,018 | 0,037 |

Prøvetyper:

A pastis, blind dobbeltprøve

B pastis, opdelt niveau (*)

C pastis, blind dobbeltprøve

D pastis, blind dobbeltprøve

E pastis, blind dobbeltprøve.

▼M1

## VII. CHALCONER. METODE TIL PÅVISNING AF CHALCONER I PASTIS VED HØJPERFORMANS VÆSKEKROMATOGRAFI

1. **Anvendelsesområde**

Metoden er velegnet til bestemmelse af, hvorvidt der er chalconer til stede i drikkevarer med anissmag eller ikke. Chalconer hører til flavonoiderne og er naturlige farvestoffer, som findes i lakridstræ (*Glycyrrhiza glabra*).

For at spiritus med anissmag kan kaldes »pastis«, skal den indeholde chalconer (forordning (EØF) nr. 1576/89).

2. **Normative referencer**

ISO 3696 1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods.

3. **Princip**

Der fremstilles en referenceopløsning af lakridsekstrakt. Tilstedeværelse eller fravær af chalconer bestemmes ved højperformans væskekromatografi (HPLC) med UV-detektion.

4. **Reagenser og materialer**

Til analysen må kun benyttes reagenser af HPLC-kvalitet. Den anvendte ethanol skal være 96 % v/v. Der må kun anvendes vand af kvalitet 3 som fastlagt i ISO 3696.

4.1. Ethanol 96 % v/v (CAS 64-17-5).

4.2. Acetonitril, $CH_3CN$ (CAS 75-05-8).

4.3. Referencestof: Glycyrrhiza glabra (lakridstræ).

Groftrevet lakridstræ (*Glycyrrhiza glabra*). Gennemsnitsstørrelse af stavformede partikler: længde: 10-15 mm, tykkelse: 1-3 mm.

4.4. Natriumacetat, $CH_3COONa$ (CAS 127-09-3).

4.5. Iseddikesyre, $CH_3COOH$ (CAS 64-19-7).

4.6. Fremstilling af opløsninger

4.6.1. Ethanol 50 % v/v.

Til 1 000 ml ved 20 ºC:

— 96 % v/v ethanol (4.1): 521 ml

— vand (2.0): 511 ml.

4.6.2. Opløsningsmiddel A: acetonitril.

Acetonitril (4.2) af en kvalitet svarende til HPLC-analyse.

Der afgasses.

4.6.3. Opløsningsmiddel B: 0,1 M natriumacetatbuffer, pH 4,66.

8,203 g natriumacetat (4.4) afvejes og tilsættes 6,005 g iseddikesyre (4.5), hvorefter der i en 1 000 ml målekolbe fyldes op til stregen med vand (2).

5. **Fremstilling af referenceekstrakt af Glycyrrhiza glabra (4.3)**

5.1. 10 g revet lakridstræ (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) afvejes og anbringes i en rundbundet destillationskolbe.

— Der tilsættes 100 ml 50 % v/v ethanol (4.6.1).

— Der koges med tilbagesvaling i en time.

— Opløsningen filtreres.

— Filtratet stilles til side til senere brug.

5.2. Lakridstræsekstrakten uddrages fra filteret.

— Den anbringes i en rundbundet destillationskolbe.

— Der tilsættes 100 ml 50 % v/v ethanol (4.6.1).

— Der koges med tilbagesvaling i en time.

— Opløsningen filtreres. Filtratet stilles til side til senere brug.

▼M1

5.3. Ekstraheringen af lakridstræet skal udføres tre på hinanden følgende gange.

5.4. De tre filtrater sammenhældes.

5.5. Opløsningsmiddelfasen (fra 5.4) inddampes i en rotationsinddamper.

5.6. Resten af ekstrakten (fra 5.5) opsamles med 100 ml 50 % v/v ethanol (4.6.1).

6. **Apparatur og udstyr**

6.1. Adskillelsessystem

6.1.1. Højperformans-væskekromatograf.

6.1.2. Et pumpesystem, som kan opnå og opretholde en konstant eller programmeret gennemstrømningshastighed ved højt tryk.

6.1.3. Et detektionssystem for UV/synligt lys, som kan stilles på 254 og 370 nm.

6.1.4. System til afgasning af opløsningsmiddel

6.1.5. En kolonneovn, som kan indstilles på en temperatur af 40 ± 0,1 ºC.

6.2. En dataintegrator eller -registrator med en ydeevne, som er forenelig med resten af adskillelsessystemet.

6.3. Kolonne

Materiale: rustfrit stål eller glas.

Indre diameter: 4-5 mm.

Stationær fase: tværbundet silica med en octadecyl (C18) funktionel gruppe, partikelstørrelse maks. 5 µm (tværbundet fase).

6.4. Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder:

6.4.1. Analysevægt (nøjagtighed: ± 0,1 mg).

6.4.2. Destillationsapparat med tilbagesvaler, bestående af f.eks.:

— 250 ml rundkolbe med standardslib
— en 30 cm lang tilbagesvaler, og
— en varmekilde (eventuelle pyrogene reaktioner, som inddrager det ekstraherede stof, skal undgås ved passende foranstaltninger).

6.4.3. Rotationsfordamper.

6.4.4. Filtreringsopstilling (dvs. Büchner-tragt).

6.5. Betingelser for kromatografi (eksempel)

6.5.1. Elueringskarakteristika for opløsningsmiddel A (4.6.2) og B (4.6.3):

— gradientændring fra 20/80 (v/v) til 50/50 (v/v) på 15 minutter
— gradientændring fra 50/50 (v/v) til 75/25 (v/v) på 5 minutter
— ensartet styrke på 75/25 (v/v) i 5 minutter
— stabilisering af kolonnen mellem injektionerne
— ensartet styrke 20/80 (v/v) i 5 minutter.

6.5.2. Gennemstrømningshastighed: 1 ml/minut.

6.5.3. Indstilling af UV-detektor

Detektoren indstilles på 370 nm for at påvise chalconer og derefter på 254 nm for at påvise glycyrrhizinsyre.

*Bemærkning:* Ændringen i bølgelængde (fra 370 til 254 nm) skal finde sted 30 sekunder før starten af elueringstoppen for glycyrrhizinsyre.

7. **Fremgangsmåde**

7.1. Fremstilling af spiritusprøven

Der filtreres gennem et filter til organiske opløsningsmidler (porediameter: 0,45 µm).

7.2. Fremstilling af restekstrakt (5.6) af lakridstræ

Før analyse fremstilles en fortynding i forholdet 1:10 med 50 % v/v ethanol (4.6.1).

▼M1

7.3. Bestemmelse

7.3.1. Der injiceres 20 µl af den fremstillede lakridstræsekstrakt (7.2). Analysen udføres ved de ovenfor (6.5) beskrevne betingelser for kromatografi.

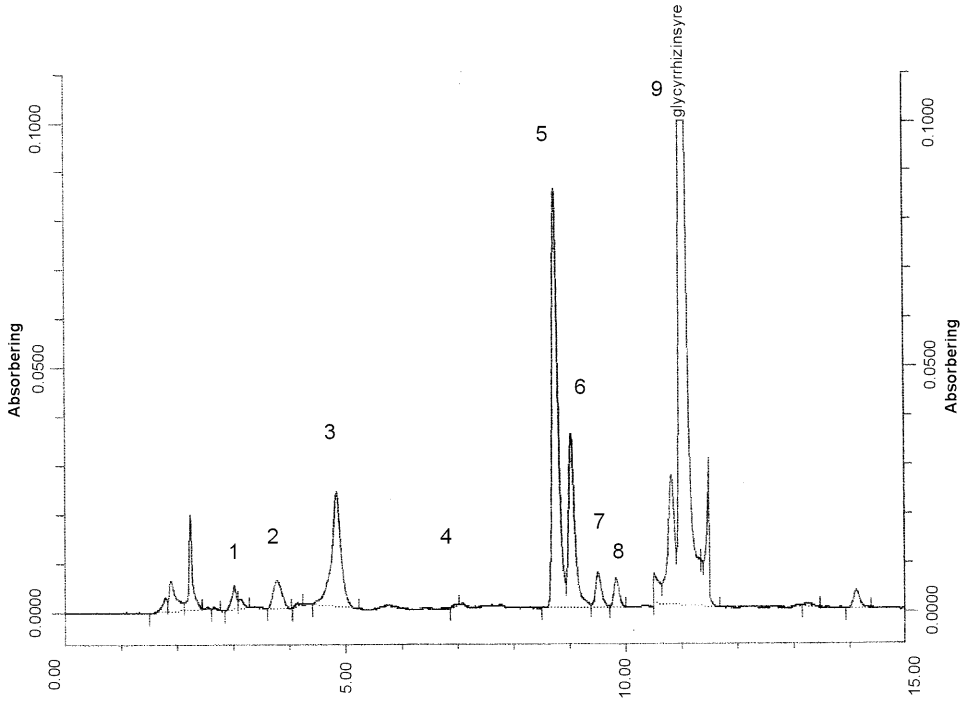
7.3.2. Injicer 20 µl af prøveopløsningen (7.1) (spiritusprøve med anissmag). Analysen udføres ved de ovenfor (6.5) beskrevne betingelser for kromatografi.

7.3.3. De to kromatogrammer sammenholdes. Der skal være udtalt lighed mellem de to kromatogrammer i udgangsområdet for chalconer (ved detektion ved 370 nm under de ovenfor beskrevne analysebetingelser) (se figur 1).

8. **Karakteristisk kromatogram for en pastis**

*Figur 1*

Kromatogram, som er optegnet ved ovenstående metode og viser tilstedeværelse af chalconer i en »pastis«. Top 1-8 er chalconer, top 9 er glycyrrhizinsyre




9. **Metodens funktionsdata (præcision)**

Resultater af interkalibrering:

Følgende tabel viser præstationer ved bestemmelse af tilstedeværelse eller manglende tilstedeværelse af chalconer i pastis og spiritus med anissmag.

Følgende data er opnået i en international metodekvalitetsundersøgelse, der er udført efter internationalt anerkendte procedurer.

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1998 |
| Antal laboratorier: | 14 |
| Antal prøveemner: | 11 |
| Analysand: | chalconer. |

▼**M1**

| Prøver | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter eliminering af laboratorier med afvigende resultater | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 13 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | — | — | — | — | — | 1 (*) |
| Antal accepterede resultater | 28 | 14 | 14 | 28 | 28 | 26 |
| Antal resultater for tilstedeværelse af chalconer | 28 | 14 | 14 | 0 | 28 | 0 |
| Antal resultater for manglende tilstedeværelse af chalconer | 0 | 0 | 0 | 28 | 0 | 26 |
| Procentdel korrekte resultater (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

(*) Resultaterne af de to dobbeltprøver er inkonsistente, hvilket tilskrives fejl ved prøvetagningen.

| Prøver | G | H | I | J | K |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter eliminering af laboratorier med afvigende resultater | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | — | — | — | — | — |
| Antal accepterede resultater | 28 | 14 | 14 | 28 | 28 |
| Antal resultater for tilstedeværelse af chalconer | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Antal resultater for manglende tilstedeværelse af chalconer | 28 | 14 | 14 | 28 | 28 |
| Procentdel korrekte resultater (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Prøvetyper:

A pastis, blind dobbeltprøve

B pastis, enkeltprøve

C pastis, enkeltprøve

D »pastis« (indeholder ikke chalconer), blind dobbeltprøve

E »pastis« (indeholder ikke chalconer), blind dobbeltprøve

F likør med anissmag (indeholder ikke chalconer), blind dobbeltprøve

G likør med anissmag (indeholder ikke chalconer), blind dobbeltprøve

H ouzo (indeholder ikke chalconer), enkeltprøve

I ouzo (indeholder ikke chalconer), enkeltprøve

J anis (indeholder ikke chalconer), blind dobbeltprøve

K »pastis« (indeholder ikke chalconer), blind dobbeltprøve.

▼M1

## IX. ÆGGEBLOMME. BESTEMMELSE AF ÆGGEBLOMMEKONCENTRATIONEN I SPIRITUS — FOTOMETRISK METODE

1. **Anvendelsesområde**

Metoden er egnet til bestemmelse af koncentrationen af æggeblomme i området 40-250 g/l i æggelikør og likør med æg.

2. **Normative referencer**

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods.

3. **Princip**

Æggeblommens alkoholopløselige fosforforbindelser ekstraheres og bestemmes fotometrisk som fosformolybdatkompleks.

4. **Reagenser og materialer**

4.1. Dobbeltdestilleret vand.

4.2. Kiselgur.

4.3. Ethanol 96 % vol. (CAS 64-17-5).

4.4. 15 % opløsning af magnesiumacetat (CAS 16674-78-5).

4.5. 10 % svovlsyre (CAS 7664-93-9).

4.6. 1 N svovlsyre.

4.7. En 0,16 g/l opløsning af kaliumdihydrogenphosphat $KH_2PO_4$ (CAS 778-77-0).

4.8. Reagens for bestemmelse af phosphat

20 g ammoniummolybdat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (CAS 12054-85-2), opløses i 400 ml vand ved 50 ºC.

I et andet kar opløses 1 g ammoniumvanadat $NH_4VO_3$, (CAS 7803-55-6), i 300 ml varmt vand, opløsningen henstilles til den er afkølet, hvorefter der tilsættes 140 ml koncentreret salpetersyre (CAS 7697-37-2). De afkølede opløsninger overføres til samme 1 000 ml målekolbe, og der fyldes op til 1 000 ml-stregen.

5. **Apparatur og udstyr**

5.1. 100 ml konisk kolbe.

5.2. Ultralydsbad (eller magnetomrører).

5.3. 100 ml målekolbe.

5.4. 20 ºC vandbad.

5.5. Filter (Whatman nr. 4 eller tilsvarende).

5.6. Digel af porcelæn (eller platin).

5.7. Kogende vandbad.

5.8. Varmeplade.

5.9. Muffelovn.

5.10. 50 ml-målekolbe.

5.11. 20 ml-målekolbe.

5.12. Spektrofotometer indstillet på 420 nm.

5.13. 1 cm-kuvette.

6. **Prøver**

Prøver opbevares ved rumtemperatur inden analysen.

7. **Fremgangsmåde**

7.1. Tilberedning af prøver

7.1.1. I en 100 ml-konisk kolbe (5.1) afvejes 10 g prøve.

▼**M1**

7.1.2. Der tilsættes gradvis 70 ml ethanol (4.3) i små portioner, idet der omrystes for hver portion, hvorefter blandingen stilles i ultralydsbad (5.2) i 15 minutter (eller omrøres med magnetomrører (5.2) i 10 minutter ved rumtemperatur).

7.1.3. Kolbens indhold overføres til en 100 ml-målekolbe (5.3) ved skylning med ethanol (4.3). Der fyldes op til stregen med ethanol (4.3), og kolberne anbringes i et 20 ºC vandbad (5.4). Ved 20 ºC justeres til stregen.

7.1.4. Der tilsættes lidt kiselgur (4.2) og filtreres (5.5), idet de første 20 ml kasseres.

7.1.5. 25 ml af filtratet overføres til en digel (5.6.) af porcelæn (eller platin). Filtratet skal derefter koncentreres ved forsigtig inddampning i kogende vandbad (5.7) efter tilsætning af 5 ml af en 15 % magnesiumacetatopløsning (4.4).

7.1.6. Diglerne anbringes på varmeplade (5.8) og opvarmes, til de netop er tørre.

7.1.7. Inddampningsresten glødes ved 600 ºC i en muffelovn (5.9), indtil asken er hvid, i mindst halvanden time, men kan glødes natten over.

7.1.8. Asken opløses i 10 ml 10 % svovlsyre (4.5) og overføres ved skylning med destilleret vand (4.1) til en 50 ml-målekolbe (5.10), som ved rumtemperatur fyldes op til stregen med destilleret vand (4.1). En 5 ml alikvot mængde af denne askeopløsning benyttes til fremstilling af prøveopløsning til fotometrisk phosphatbestemmelse.

7.2. Fotometrisk phosphatbestemmelse

7.2.1. Sammenligningsopløsning

7.2.1.1. 10 ml 10 % svovlsyre (4.5) hældes i en 50 ml-målekolbe (5.10), som fyldes op til stregen med destilleret vand (4.1).

7.2.1.2. En 5 ml alikvot mængde af denne opløsning (7.2.1.1) overføres til en 20 ml målekolbe (5.11), hvorefter der tilsættes 1 ml 1 N svovlsyre (4.6) og 2 ml phosphatreagens (4.8) og fyldes op til 20 ml med destilleret vand (4.1).

7.2.1.3. Der lukkes med løstsiddende prop, omrystes og varmes i kogende vandbad (5.7) i 10 minutter, hvorefter der afkøles i 20 ºC vandbad (5.4) i 20 minutter.

7.2.1.4. En 1 cm kuvette (5.13) fyldes med denne sammenligningsopløsning.

7.2.2. Prøveopløsning

7.2.2.1. En 5 ml alikvot mængde af askeopløsningen (7.1.8) overføres til en 20 ml målekolbe (5.11) og tilsættes 1 ml 1 N svovlsyre (4.6) og 2 ml phosphatreagens (4.8), hvorefter der fyldes op til 20 ml med destilleret vand (4.1).

7.2.2.2. Der lukkes med løstsiddende prop, omrystes og varmes i kogende vandbad (5.7) i 10 minutter, hvorefter der afkøles i 20 ºC vandbad (5.4) i 20 minutter.

7.2.2.3. Den resulterende gule opløsning analyseres straks spektrofotometrisk (5.12) i en 1 cm kuvette (5.13) ved 420 nm over for sammenligningsopløsningen (7.2.1.4).

7.2.3. Kalibreringskurve

7.2.3.1. Til optegning af kalibreringskurven overføres 2 ml alikvote mængder af phosphatreagenset (4.8) i 20 ml målekolber (5.11), som hver indeholder 1 ml 1 N svovlsyre (4.6) og henholdsvis 0, 2, 4, 6, 8 og 10 ml af kaliumdihydrogenphosphat-opløsningen (4.7), hvorefter der fyldes op til 20 ml-stregen med destilleret vand (4.1).

7.2.3.2. Der lukkes med en løstsiddende prop, omrystes og varmes i kogende vandbad (5.7) i 10 minutter, hvorefter der afkøles i 20 ºC vandbad (5.4) i 20 minutter og analyseres spektrofotometrisk (5.12) i en 1 cm kuvette (5.13) ved 420 nm over for sammenligningsopløsningen (7.2.1.4).

7.2.3.3. Optegning af kalibreringskurve

| Dihydrogenphosphatopløsning (ml) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $P_2O_5$ (mg) | 0 | 0,167 | 0,334 | 0,501 | 0,668 | 0,835 |

▼M1

8. **Angivelse af resultater**

Koncentrationen af æggeblomme i g/l beregnes af følgende formel:

$$\text{g/L æggeblomme} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{massefylde}}{E/40}$$

hvor:

| | |
|---|---|
| 110 | er omregningsfaktor for total mængde $P_2O_5$ i g i 100 g æggeblomme |
| mg $P_2O_5$ | er værdi fastlagt ud fra kalibreringskurven |
| massefylde | er masse pr. rumfangsenhed (g/ml) af den æggebaserede likør ved 20 ºC |
| E | er vægtmængde æggebaseret likør i g |
| 40 | er fortyndingsfaktor for en 5 ml alikvot af askeopløsningen. |

9. **Metodens funktionsdata (præcision)**

Statistiske resultater af interkalibrering:

Følgende tabel indeholder værdier for æggeblomme.

Følgende data er opnået i en international metodekvalitetsundersøgelse, der er udført efter internationalt anerkendte procedurer.

| | |
|---|---|
| År for interkalibrering: | 1998 |
| Antal laboratorier: | 24 |
| Antal prøver: | 5 |
| Analysand: | æggeblomme. |

| Prøver | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| Antal laboratorier efter elimination af laboratorier med afvigende resultater | 19 | 20 | 22 | 20 | 22 |
| Antal laboratorier med afvigende resultater | 3 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| Antal accepterede resultater | 38 | 40 | 44 | 40 | 44 |
| Gennemsnitsværdi | 147,3 | 241,1 | 227,4 | 51,9 (*)<br>72,8 (*) | 191,1 |
| Standardafvigelse af repeterbarhed ($S_r$) g/l | 2,44 | 4,24 | 3,93 | 1,83 | 3,25 |
| Relativ standardafvigelse af repeterbarhed ($RSD_r$) (%) | 1,7 | 1,8 | 1,8 | 2,9 | 1,7 |
| Repeterbarhedsgrænse (r) g/l | 6,8 | 11,9 | 11,0 | 5,1 | 9,1 |
| Standardafvigelse af reproducerbarhed ($S_R$) g/l | 5,01 | 6,06 | 6,66 | 3,42 | 6,87 |
| Relativ standardafvigelse af reproducerbarhed ($RSD_R$) (%) | 3,4 | 2,5 | 2,9 | 5,5 | 3,6 |
| Reproducerbarhedsgrænse (R) g/L | 14,0 | 17,0 | 18,7 | 9,6 | 19,2 |

Prøvetyper:

A Advocaat, blind dobbeltprøve

B Advocaat, blind dobbeltprøve

C Advocaat, blind dobbeltprøve

D Advocaat (fortyndet), opdelte niveauer (*)

E Advocaat, blind dobbeltprøve.