Tämä asiakirja on ainoastaan dokumentointitarkoituksiin. Toimielimet eivät vastaa sen sisällöstä.

►**B**

KOMISSION ASETUS (EY) N:o 2870/2000, annettu 19 päivänä joulukuuta 2000, tislattujen alkoholijuomien analysoinnissa sovellettavista yhteisön vertailumenetelmistä

(EYVL L 333, 29.12.2000, s. 20)

Muutettu:

		virallinen lehti		
		N:o	sivu	päivämäärä
►**M1**	Komission asetus (EY) N:o 2091/2002, annettu 26 päivänä marraskuuta 2002	L 322	11	27.11.2002

▼B

KOMISSION ASETUS (EY) N:o 2870/2000,

annettu 19 päivänä joulukuuta 2000,

tislattujen alkoholijuomien analysoinnissa sovellettavista yhteisön vertailumenetelmistä

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon tislattujen alkoholijuomien määritelmää, kuvausta ja esittelyä koskevista yleisistä säännöistä 29 päivänä toukokuuta 1989 annetun neuvoston asetuksen (ETY) N:o 1576/89 ([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna Itävallan, Suomen ja Ruotsin liittymisasiakirjalla, ja erityisesti sen 4 artiklan 8 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Asetuksen (ETY) N:o 1576/89 4 artiklan 8 kohdassa säädetään tislattujen alkoholijuomien analysoinnissa käytettävien menetelmien määräämisestä. Virallisissa tarkastuksissa ja kiistatapauksissa on käytettävä vertailumenetelmiä, joiden avulla voidaan varmistaa asetuksen (ETY) N:o 1576/89 ja tislattujen alkoholijuomien määritelmää, kuvausta ja esittelyä koskevista yksityiskohtaisista täytäntöönpanosäännöistä 24 päivänä huhtikuuta 1990 annetun komission asetuksen (ETY) N:o 1014/90 ([2]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (EY) N:o 2140/98 ([3]), säännösten noudattaminen.

(2) Yhteisön vertailumenetelmiksi olisi mahdollisuuksien mukaan annettava ja kuvattava yleisesti hyväksyttyjä menetelmiä.

(3) Tieteen kehityksen ja virallisten laboratorioiden erilaisen teknisen välineistön huomioon ottamiseksi olisi sallittava laboratorion johtajan vastuulla muihin mittausperiaatteisiin kuin tämän asetuksen liitteessä kuvattuihin vertailumenetelmiin perustuvien menetelmien käyttö, jos kyseiset menetelmät tarjoavat riittävät takeet tuloksista ja täyttävät erityisesti elintarvikkeiden tarkastuksessa tarvittavien yhteisön näytteenottomenettelyjen ja analyysimenetelmien käyttöön ottamisesta 20 päivänä joulukuuta 1985 annetussa neuvoston direktiivin 85/591/ETY ([4]) liitteessä säädetyt vaatimukset ja jos voidaan osoittaa, että kyseisillä menetelmillä saatujen tulosten tarkkuuden, toistettavuuden ja uusittavuuden vaihteluväli on samanlainen kuin tässä asetuksessa kuvatuilla vertailumenetelmillä saaduilla tuloksilla. Muiden vertailumenetelmien käyttö olisi hyväksyttävä, jos edellä mainittu ehto täyttyy. Kuitenkin on täsmennettävä, että kiistatapauksissa kyseiset muut menetelmät eivät voi korvata vertailumenetelmiä.

(4) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat tislattuja alkoholijuomia käsittelevän täytäntöönpanokomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Tämän asetuksen liitteessä esitetään tislattujen alkoholijuomien analysoinnissa sovellettavat yhteisön vertailumenetelmät, joita on käytettävä

— virallisissa tarkastuksissa, tai

— kiistatapauksissa

asetuksen (ETY) N:o 1576/89 ja asetuksen (ETY) N:o 1014/90 säännösten noudattamisen varmistamiseksi.

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

▼B

2 artikla

Edellä olevan 1 artiklan ensimmäisestä luetelmakohdasta poiketen muita määritysmenetelmiä voidaan käyttää laboratorion johtajan vastuulla, jos näillä menetelmillä saadut tulokset ovat vähintäänkin yhtä tarkkoja ja täsmällisiä (toistettavuus ja uusittavuus) kuin liitteessä mainituilla vertailumenetelmillä saadut tulokset.

3 artikla

Jos tietyn tislatun alkoholijuoman sisältämien aineiden osoittamiseen ja määrittämiseen ei ole säädetty yhteisön vertailumenetelmiä, käytetään:

a) määritysmenetelmiä, jotka on validoitu tunnustettujen kansainvälisten menettelyjen mukaisesti ja jotka täyttävät erityisesti direktiivin 85/591/ETY liitteessä mainitut vaatimukset;

b) Kansainvälisen standardointijärjestön (ISO) suosittamien standardien mukaisia määritysmenetelmiä;

c) Kansainvälisen viinijärjestön (OIV) yleiskokouksen tunnustamia ja julkaisemia määritysmenetelmiä; tai

d) jos käytettävissä ei ole a, b tai c kohdassa tarkoitettua menetelmää,

— kyseisen jäsenvaltion hyväksymää määritysmenetelmää,

— tarvittaessa muita asianmukaisia määritysmenetelmiä,

jotka ovat riittävän tarkkoja, toistettavia ja uusittavia.

4 artikla

Tätä asetusta sovellettaessa:

a) ”toistettavuusraja” on arvo, jota pienempi tai yhtä suuri kahden toistettavuusolosuhteissa (sama suorittaja, sama laite, sama laboratorio ja lyhyt aikaväli) saadun tuloksen välisen erotuksen itseisarvo on 95 prosentin todennäköisyydellä {ISO 3534-1};

b) ”uusittavuusraja” on arvo, jota pienempi tai yhtä suuri kahden uusittavuusolosuhteissa (eri suorittaja, eri laite ja eri laboratorio) saadun tuloksen välisen erotuksen itseisarvo on 95 prosentin todennäköisyydellä {ISO 3534-1};

c) ”tarkkuus” on koetuloksen ja hyväksytyn vertailuarvon välinen erotus {ISO 3534-1}.

5 artikla

Tämä asetus tulee voimaan seitsemäntenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä*.

Sitä sovelletaan 1 päivästä tammikuuta 2001.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

▼B

LIITE

ANALYYTTISET VERTAILUMENETELMÄT SEURAAVILLE PARAMETREILLE:

I	Alkoholipitoisuuden määritys tilavuusprosenttina
	Lisäys I: Tisleen valmistus
	Lisäys II: Tisleen tiheyden määritys
	— Menetelmä A = pyknometria
	— Menetelmä B = elektroninen tiheysmittari
	— Menetelmä C = hydrostaattiseen vaakaan perustuva tiheysmittari
II	Kuiva-aineen kokonaismäärän gravimetrinen määritys
III	Haihtuvien aineiden ja metanolin määritys
III.1	Yleiset huomautukset
III.2	Haihtuvat yhdisteet, korkeammat alkoholit, etyyliasetaatti ja metanoli (kaasukromatografia)
III.3	Haihtuvat hapot — menetelmä julkaistaan myöhemmin
IV	Syaanivetyhappo — menetelmä julkaistaan myöhemmin
V	Anetoli ►M1 ——— ◄
VI	Glysyritsiinihappo ►M1 ——— ◄
VII	Kalkonit ►M1 ——— ◄
VIII	Sokerin kokonaismäärä — menetelmä julkaistaan myöhemmin
IX	Munankeltuainen ►M1 ——— ◄.

▼B

I TISLATTUJEN ALKOHOLIJUOMIEN ALKOHOLIPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN TILAVUUSPROSENTTINA

Johdanto

Vertailumenetelmäohje käsittää kaksi lisäystä:

Lisäys I: Tisleen valmistaminen

Lisäys II: Määritys tisleestä

1 Soveltamisala

Menetelmä soveltuu tislattujen alkoholijuomien todellisen alkoholipitoisuuden määrittämiseen tilavuusprosenttina.

2 Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin

ISO 3696:1987: Analyyttiseen käyttöön tarkoitettu vesi — Laatuvaatimukset ja testausmenetelmät.

3 Termit ja määritelmät

3.1 *Vertailulämpötila:*

Tislattujen alkoholijuomien alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina sekä niiden tiheys ja ominaispaino määritetään 20 ºC:n lämpötilassa.

Huomautus 1: Termi ”t ºC:n lämpötilassa” on varattu kaikille (tiheyden tai tilavuusprosenttina ilmaistun alkoholipitoisuuden) määrityksille, jotka ilmoitetaan muussa kuin vertailulämpötilassa 20 ºC.

3.2 *Tiheys:*

Tiheys tarkoittaa tislattujen alkoholijuomien massaa tilavuusyksikköä kohti tyhjiössä 20 ºC:n lämpötilassa. Se ilmoitetaan kilogrammoina kuutiometriä kohti, ja sen symboli on $\rho_{20\,^{\circ}C}$ tai ρ_{20}.

3.3 *Ominaispaino:*

Ominaispaino on 20 ºC:n lämpötilassa määritetyn tislatun alkoholijuoman tiheyden ja samassa lämpötilassa määritetyn veden tiheyden välinen suhde ilmaistuna desimaalilukuna. Siitä käytetään symbolia $d_{20\,^{\circ}C/20\,^{\circ}C}$ tai $d_{20/20}$ tai yksinkertaisesti d-kirjainta, ellei väärinkäsityksen mahdollisuutta ilmene. Määritetty ominaisuus on mainittava määritystodistuksessa käyttäen ainoastaan edellä määriteltyjä symboleja.

Huomautus 2: Ominaispaino voidaan saada 20 ºC:n lämpötilassa määritetystä tiheydestä ρ_{20} seuraavasti:

$\rho_{20} = 998{,}203 \times d_{20/20}$ tai $d_{20/20} = \rho_{20/998{,}203}$ jolloin 998,203 on veden tiheys 20 ºC:n lämpötilassa.

3.4 *Todellinen alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina:*

Tislattujen alkoholijuomien todellinen alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina on yhtä kuin etanolin määrä litroina 100 litrassa sellaista vesi-alkoholiseosta, jolla on sama tiheys kuin alkoholilla tai alkoholijuomalla tislauksen jälkeen. Vertailuarvot, joita on käytettävä 20 ºC:n lämpötilassa tilavuusprosenttina määritetyn alkoholipitoisuuden ja 20 ºC:n lämpötilassa mitatun tiheyden suhteelle erilaisille vesi-alkoholiseoksille, annetaan kansainvälisessä taulukossa, jonka OIML (Organisation internationale de métrologie légale) on vahvistanut suosituksessaan nro 22.

Yleinen yhtälö, jolla esitetään suhde tilavuusprosenttina ilmaistun alkoholipitoisuuden ja tiheyden välillä tietyssä lämpötilassa olevalle vesi-alkoholiseokselle, annetaan komission asetuksen (ETY) N:o 2676/90 liitteen sivulla 40 luvussa 3 ”Alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina” (EYVL L 272, 3.10.1990, s. 1) tai kansainvälisen viinijärjestön (OIV) analyysimenetelmiä koskevassa käsikirjassa (1994) sivulla 17.

Huomautus 3: Koska likööri en ja kermalikööri en tilavuutta on vaikea määrittää tarkasti, niiden osalta näyte on punnittava ja alkoholipitoisuus on laskettava ensin massaprosenttina.

▼B

Muuntokaava:

$$\text{Alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina} = \frac{\text{ASM (massaprosenttia)} \times \rho_{20}\text{ (näyte)}}{\rho_{20}\text{ (alkoholi)}}$$

jossa ASM = alkoholipitoisuus massaprosenttina,

ρ_{20} (alkoholi) = 789,24 kg/m^3.

4 **Periaate**

Tislauksen jälkeen tisleen alkoholipitoisuus määritetään tilavuusprosenttina pyknometrillä, elektronisella tiheysmittarilla tai hydrostaattiseen vaakaan perustuvalla tiheysmittarilla.

▼B

LISÄYS I: TISLEEN VALMISTUS

1 **Soveltamisala**

Menetelmä soveltuu tisleiden valmistamiseksi tislattujen alkoholijuomien todellisen alkoholipitoisuuden määrittämiseksi tilavuusprosenttina.

2 **Periaate**

Alkoholijuomat tislataan etanolin ja muiden haihtuvien yhdisteiden erottamiseksi uutoksesta (aineista, jotka eivät tislaudu).

3 **Reagenssit ja materiaalit**

3.1 Keitinkivet.

3.2 Konsentroitu vaahdonestoemulsio (kermaliköörejä tislattaessa).

4 **Laitteet ja välineet**

Tavanomaiset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

4.1 Vesihaude, jonka lämpötila voidaan pitää alueella 10—15 ºC.

Vesihaude, jonka lämpötila voidaan pitää 20 ºC:ssa (± 0,2 ºC).

4.2 Mittapulloja, luokka A, 100 ml, jotka on varmennettu tarkkuuteen ± 0,1 %, ja 200 ml, jotka on varmennettu tarkkuuteen 0,15 %.

4.3 Tislauslaite:

4.3.1 Yleiset vaatimukset

Tislauslaitteen on täytettävä seuraavat vaatimukset:

— liitoksia tulee olla niin vähän kuin on mahdollista tiiviyden varmistamiseksi,

— tislauslaitteen tulee sisältää laite, jonka tarkoitus on estää kupliminen (kiehuvan nesteen kulkeutuminen höyryn mukana) ja säätää runsaasti alkoholia sisältävien höyryjen tislautumisnopeutta,

— alkoholihöyryt on voitava nesteyttää nopeasti ja täydellisesti,

— ensimmäiset tislausfraktiot on otettava talteen veteen.

Lämmönlähdettä on käytettävä yhdessä sopivan lämmönhajoittimen kanssa, jotta uutos ei hajoa eikä pala kiinni astiaan.

4.3.2 Esimerkki sopivasta tislauslaitteesta on esitetty kuvassa 1. Laitteessa on seuraavat osat:

— standardoidulla lasihioksella varustettu pyörökolvi, jonka tilavuus on 1 litra,

— väkevöimiskolonni, jonka korkeus on vähintään 20 cm (esimerkiksi Vigreux-kolonni),

— kulmaliitos, joka on varustettu kohtisuoraan asennetulla, noin 10 cm:n pituisella suorareunaisella jäähdyttimellä (West-tyyppinen jäähdytin),

— jäähdytyskierukka, jonka pituus on 40 cm,

— ulostuloputki, joka ohjaa tisleen pienen määrän vettä sisältävään mittapulloon.

Huomautus: Edellä kuvatun laitteen on oltava tarkoitettu vähintään 200 ml:n näytteelle. Laitetta voidaan kuitenkin mukauttaa siten, että se soveltuu pienemmälle näyteannokselle, käyttämällä pienempää tislauskolvia edellyttäen, että käytetään roiskeenestokupua tai jotakin muuta laitetta estämään nesteen kulkeutuminen höyryn mukana.

5 **Tutkittavan näytteen säilytys**

Näytteet varastoidaan huoneenlämpötilassa ennen analyysiä.

6 **Suoritus**

Alkuhuomautus:

Tislaus voidaan toteuttaa myös käyttämällä IUPAC:n julkaisemaa menetelmää (1968).

6.1 Tislauslaitteen testaaminen

▼B

Käytettävän laitteen on läpäistävä seuraava koe:

Kun laitteella tislataan 200 ml vesi-alkoholiliuosta, jonka konsentraatio on noin 50 tilavuusprosenttia alkoholia, alkoholihäviö saa olla enintään 0,1 tilavuusprosenttia.

6.2 Alle 50 tilavuusprosenttia alkoholia sisältävät tislatut alkoholijuomat

Mittapulloon annostellaan 200 ml alkoholijuomaa.

Tämän nesteen lämpötila kirjataan tai nestettä säilytetään vakiolämpötilassa (20 ºC).

Näyte kaadetaan tislauslaitteen pyörökolviin ja mittapullo huuhdellaan kolme kertaa käyttäen kullakin huuhtelukerralla noin 20 ml tislattua vettä. Kaikki huuhtelunesteet lisätään tislauskolviin.

Huomautus: Tämä 60 ml:n laimennus on riittävä alkoholijuomille, jotka sisältävät vähemmän kuin 250 g kuiva-ainetta litraa kohti. Muutoin pyrolyysin estämiseksi huuhteluveden tilavuuden on oltava vähintään 70 ml, jos kuiva-aineen konsentraatio on 300 g/l, 85 ml, jos kuiva-aineen konsentraatio on 400 g/l, ja 100 ml, jos kuiva-aineen konsentraatio on 500 g/l (jotkut hedelmä- tai kermaliköörit). Nämä tilavuudet suhteutetaan näytetilavuuden mukaan.

Lisätään joitakin keitinkiviä (3.1) (ja vaahdonestoainetta, jos kyseessä ovat kermaliköörit).

Kaadetaan 20 ml tislattua vettä alkuperäiseen 200 ml:n mittapulloon, jota käytetään tisleen talteen ottamiseksi. Tämä pullo on sitten asetettava kylmään vesihauteeseen (4.1) (10—15 ºC:n lämpötilaan, jos kyseessä on aniksella maustettu alkoholijuoma).

Pullon sisältöä tislataan välttäen nesteen kulkeutumista höyryn mukana ja pohjaan palamista sekä sekoittaen pullon sisältöä säännöllisesti, kunnes tisleen pinta on muutamia millimetrejä mittapullon kalibrointimerkin alapuolella.

Kun tämä tisle on jäähdytetty ± 0,5 ºC:n päähän nesteen alkuperäisestä lämpötilasta, pullo täytetään merkkiin saakka tislatulla vedellä ja sen sisältöä sekoitetaan perusteellisesti.

Tätä tislettä käytetään alkoholipitoisuuden määrittämiseksi tilavuusprosenttina (Lisäys II).

6.3 Yli 50 tilavuusprosenttia alkoholia sisältävät tislatut alkoholijuomat

Annostellaan 100 ml:n mittapulloon 100 ml alkoholijuomaa ja kaadetaan se tislauslaitteen pyörökolviin.

Mittapullo huuhdellaan useita kertoja tislatulla vedellä ja huuhtelunesteet lisätään pyörökolviin. Käytetään riittävä määrä vettä siten että kolvin sisällön tilavuudeksi saadaan noin 230 ml.

200 ml:n mittapulloon lisätään 20 ml tislattua vettä, johon tisle otetaan talteen. Mittapullo asetetaan sitten kylmään vesihauteeseen (4.1) (10—15 ºC aniksella maustetuille alkoholijuomille).

Kolvin sisältöä tislataan sekoittaen silloin tällöin, kunnes tisleen pinta on muutamia millimetrejä 200 ml:n mittapullon kalibrointimerkin alapuolella.

Kun tämä tisle on jäähdytetty ± 0,5 ºC:n päähän nesteen alkuperäisestä lämpötilasta, pullo täytetään merkkiin saakka tislatulla vedellä ja sen sisältöä sekoitetaan perusteellisesti.

Tätä tislettä käytetään alkoholipitoisuuden määrittämiseksi tilavuudesta. (Lisäys II).

Huomautus: Alkoholijuoman alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina on kaksi kertaa tisleen alkoholipitoisuus.

▼B

LISÄYS II: TISLEEN TIHEYDEN MÄÄRITYS

MENETELMÄ A: TISLATTUJEN ALKOHOLIJUOMIEN TODELLISEN ALKOHOLIPITOISUUDEN MÄÄRITYS TILAVUUSPROSENTTINA — MÄÄRITYS PYKNOMETRILLÄ

A.1 **Periaate**

Alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina saadaan pyknometrillä määritetystä tisleen tiheydestä.

A.2 **Reagenssit ja materiaalit**

Ellei toisin mainita, analyysissä käytetään vain hyväksyttyä analyysilaatua olevia reagensseja ja vähintään kolmannen laatuluokan vettä standardin ISO 3696:1987 määritelmän mukaisesti.

A.2.1 Natriumkloridiliuos (2-prosenttinen, paino/tilavuus)

Yksi litra natriumkloridiliuosta valmistetaan punnitsemalla 20 g natriumkloridia, joka liuotetaan yhteen litraan vettä.

A.3 **Laitteet ja välineet**

Tavanomaiset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

A.3.1 Analyysivaaka, jonka tarkkuus on 0,1 mg.

A.3.2 Hioksellinen lämpömittari, joka on kalibroitu asteen kymmenesosiin välillä 10—30 ºC. Tämän lämpömittarin on oltava sertifioitu tai varmennettu sertifioidulla lämpömittarilla.

A.3.3 Pyrex-lasinen, tilavuudeltaan noin 100 ml:n suuruinen pyknometri, joka on varustettu irrallisella hioksellisella lämpömittarilla (A.3.2). Pyknometrissä on sivuputki, jonka pituus on 25 mm ja sisähalkaisija (enintään) 1 mm ja joka päättyy kartiomaiseen lasihiokseen. Mikäli on tarkoituksenmukaista, voidaan käyttää muitakin pyknometrejä, jotka on kuvattu standardissa ISO 3507, esimerkiksi 50 ml:n pyknometriä.

A.3.4 Taarapullo, jonka ulkotilavuus on sama kuin pyknometrin (1 ml:n tarkkuudella) ja jonka massa on sama kuin pyknometrin massa, täytetään nesteellä, jonka ominaispaino on 1,01 (natriumkloridiliuos A.2.1).

A.3.5 Pyknometrin muotoon täydellisesti mukautuva lämpöeristetty suojus.

Huomautus 1: Menetelmä tislattujen alkoholijuomien tiheyden määrittämiseksi tyhjiössä edellyttää kaksikuppivaa'an, pyknometrin ja ulkoiselta tilavuudeltaan pyknometrin kanssa samansuuruisen taarapullon käyttöä ilman nosteen korjaamiseksi. Tätä yksinkertaista tekniikkaa voidaan soveltaa käyttäen yksikuppivaakaa edellyttäen, että taarapullo punnitaan uudelleen ilman nosteessa tapahtuvien muutosten seuraamiseksi ajan kuluessa.

A.4 **Suoritus**

Alkuhuomautus:

Seuraavassa menettelyssä kuvataan 100 ml:n pyknometrin käyttämistä alkoholipitoisuuden määrittämisessä; tämä pyknometri on kaikkein tarkin. On kuitenkin mahdollista käyttää pienempää pyknometriä, jonka tilavuus on esimerkiksi 50 ml.

A.4.1 Pyknometrin kalibrointi

Pyknometri kalibroidaan määrittämällä seuraavat parametrit:

— tyhjän pyknometrin taara,
— pyknometrin tilavuus 20 ºC:n lämpötilassa,
— vedellä täytetyn pyknometrin massa 20 ºC:n lämpötilassa.

A.4.1.1 Kalibrointi käyttäen yksikuppivaakaa:

Määritetään seuraavat parametrit:

— puhtaan ja kuivan pyknometrin massa (P),
— vedellä täytetyn pyknometrin massa t ºC:n lämpötilassa (P1),
— taarapullon massa (T0).

A.4.1.1.1 Punnitaan puhdas ja kuiva pyknometri (P).

▼B

A.4.1.1.2 Pyknometri täytetään huolellisesti huoneenlämpöisellä tislatulla vedellä ja lämpömittari asetetaan paikalleen.

Pyknometri pyyhitään huolellisesti kuivaksi ja asetetaan lämpöeristetyn suojuksen sisälle. Säiliötä sekoitetaan kääntelemällä, kunnes lämpömittarin osoittama lämpötila pysyy muuttumattomana.

Pyknometrin nestepinta säädetään samaan tasoon sivuputken yläreunan kanssa. Luetaan lämpötila t ºC huolellisesti ja lukema korjataan tarvittaessa lämpöasteikon mahdollisen epätarkkuuden suhteen.

Punnitaan vedellä täytetty pyknometri (P1).

A.4.1.1.3 Punnitaan taarapullo (T0).

A.4.1.1.4 Laskutoimitukset:

— Tyhjän pyknometrin taara = P – m

jossa m on ilman massa pyknometrissä

m = 0,0012 × (P1 – P)

Huomautus 2: 0,0012 on kuivan ilman tiheys 20 ºC:n lämpötilassa 760 mmHg:n paineessa.

— Pyknometrin tilavuus 20 ºC:n lämpötilassa:

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

jossa F_t on lämpötilan t ºC kerroin, joka on saatu asetuksen (ETY) N:o 2676/90 liitteen luvun 1 ”Tiheys ja ominaispaino” taulukosta I (sivu 10).

$V_{20\,°C}$ on tunnettava 0,001 ml:n tarkkuudella.

— Veden massa pyknometrissä 20 ºC:n lämpötilassa:

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ jossa 0,998203 on veden tiheys 20 ºC:n lämpötilassa.

Huomautus 3: Tarvittaessa voidaan käyttää tiheyden arvoa ilmassa 0,99715 ja alkoholipitoisuus voidaan laskea Yhdistyneen kuningaskunnan tulliviranomaisten käyttämässä ilman tiheyttä koskevassa taulukossa ilmoitetun tiheyden mukaisesti. Tässä tapauksessa pyknometrin syrjäyttämän ilman massan korjausta ei tehdä.

A.4.1.2 Kalibrointimenetelmä käyttäen kaksikuppivaakaa:

A.4.1.2.1 Taarapullo asetetaan vasemmanpuoleiseen vaakakuppiin ja puhdas, kuiva pyknometri paisuntasäiliöineen oikeanpuoleiseen vaakakuppiin. Lisätään punnuksia siihen vaakakuppiin, jossa pyknometri on, kunnes tasapaino on saavutettu: p grammaa.

A.4.1.2.2 Pyknometri täytetään huolellisesti huoneenlämpöisellä tislatulla vedellä ja lämpömittari asetetaan paikalleen; pyknometri pyyhitään huolellisesti kuivaksi ja asetetaan lämpöeristetyn suojuksen sisälle; sekoitetaan säiliötä kääntelemällä, kunnes lämpömittarin osoittama lämpötila pysyy muuttumattomana.

Pyknometrin nestepinta säädetään samaan tasoon sivuputken yläreunan kanssa. Sivuputki puhdistetaan ja paisuntasäiliö asetetaan paikalleen. Luetaan lämpötila t ºC huolellisesti ja lukema korjataan tarvittaessa lämpöasteikon mahdollisen epätarkkuuden suhteen.

Punnitaan vedellä täytetty pyknometri; p' on paino grammoina, kun tasapaino saavutetaan.

A.4.1.2.3 Laskutoimitukset:

— Tyhjän pyknometrin taara = p + m

jossa m on ilman massa pyknometrissä.

m = 0,0012 × (p – p')

— Pyknometrin tilavuus 20 ºC:n lämpötilassa:

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

jossa F_t on lämpötilan t ºC kerroin, joka on saatu asetuksen (ETY) N:o 2676/90 liitteen luvun 1 ”Tiheys ja ominaispaino” taulukosta I (sivu 10).

$V_{20\,°C}$ on tunnettava 0,001 ml:n tarkkuudella.

▼B

— Veden massa pyknometrissä 20 ºC:n lämpötilassa:

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

jossa 0,998203 on veden tiheys 20 ºC:n lämpötilassa.

A.4.2 Tutkittavan näytteen alkoholipitoisuuden määrittäminen

A.4.2.1 Yksikuppivaa'an käyttö

A.4.2.1.1 Punnitaan taarapullo, paino T1.

A.4.2.1.2 Punnitaan pyknometri valmistetun tisleen kanssa (katso Lisäys I), P2 on sen paino t ºC:n lämpötilassa.

A.4.2.1.3 Laskutoimitukset

— dT = T1 - T0

— Tyhjän pyknometrin massa määrityshetkellä

= P – m + dT

— Nesteen massa pyknometrissä t ºC:n lämpötilassa

= P2 – (P – m + dT)

— Tiheys g/ml t ºC:n lämpötilassa

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

— Tiheys t ºC:n lämpötilassa ilmoitetaan kilogrammoina kuutiometriä kohti kertomalla ($\rho_{t\,°C}$ luvulla 1 000, näin saatu arvo on ρ_t-arvo.

— ρ_t-arvo korjataan ρ_{20}-arvoksi käyttäen vesi-alkoholiseosten tiheyksien ρT taulukoita (Kansainvälisen viinijärjestön (OIV) analyysimenetelmiä koskevan käsikirjan, 1994, liitteen II taulukko II, sivut 17—29).

Taulukon vaakasuoralta riviltä, joka vastaa kokonaislukuna ilmoitettua lämpötilaa T, välittömästi t ºC:n alapuolella etsitään pienin mahdollinen ρ_t-arvon ylittävä tiheys. Tämän tiheyden alapuolella taulukossa annettua erotusta käytetään alkoholijuoman tiheyden ρ_t laskemiseksi kyseisessä lämpötilassa T, joka on ilmoitettu kokonaislukuna.

— Lämpötilarivin avulla lasketaan taulukossa välittömästi tiheyden ρ_t yläpuolella olevan tiheyden ρ′ ja lasketun tiheyden ρ_t välinen erotus. Tämä erotus jaetaan tiheyden ρ′ oikealla puolella ilmoitetulla erotuksella. Osamäärästä saadaan alkoholipitoisuuden desimaaliosa ja tämän pitoisuuden kokonaislukuosa annetaan sen sarakkeen yläosassa, jossa tiheys ρ′ on esitetty (Dt, alkoholipitoisuus).

Huomautus 4: Vaihtoehtoisesti pyknometriä pidetään vesihauteessa 20 ºC ± 0,2 ºC:n lämpötilassa, kun se täytetään merkkiin saakka.

A.4.2.1.4 Tulos

Tiheydestä ρ_{20} lasketaan todellinen alkoholipitoisuus käyttäen seuraavassa mainittuja alkoholipitoisuustaulukkoja:

Alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina 20 ºC:n lämpötilassa samassa lämpötilassa määritetyn vesi-alkoholiseoksen tiheyden funktiona saadaan kansainvälisestä taulukosta, jonka OIML on hyväksynyt suosituksessaan nro 22.

A.4.2.2 Kaksikuppivaa'an käyttö

A.4.2.2.1 Pyknometri punnitaan valmistetun tisleen kanssa (katso osa I), p″ on massa t ºC:n lämpötilassa.

A.4.2.2.2 Laskutoimitukset

— Nesteen massa pyknometrissä t ºC:n lämpötilassa

= p + m – p″

— Tiheys g/ml t ºC:n lämpötilassa

$\rho_{t\,°C} = (p + m - p'')/V_{20\,°C}$

▼B

— Tiheys t ºC:n lämpötilassa ilmoitetaan kilogrammoina kuutiometriä kohti ja lämpötilakorjaus tehdään alkoholipitoisuuden laskemiseksi 20 ºC:n lämpötilassa, kuten edellä yksikuppivaa'an käytön yhteydessä on esitetty.

A.5 **Menetelmän suoritusarvot (mittaustarkkuus)**

A.5.1 Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset

Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien [1] [2] mukaisesti.

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	20
Näytteiden lukumäärä	6

Näytteet	A	B	C	D	E	F
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	19	20	17	19	19	17
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	1	—	2	1	1	3
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	38	40	34	38	38	34
Keskiarvo ($\bar{x}$) til.-%	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), til-%	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Toistettavuusraja (r), til-%	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), til-%	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Uusittavuusraja (R), til-%	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Näytetyypit:
A Hedelmälikööri; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*)
B Brandy; rinnakkaiset sokkonäytteet
C Viski; rinnakkaiset sokkonäytteet
D Grappa; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*)
E Akvaviitti; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*)
F Rommi; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

MENETELMÄ B: TISLATTUJEN ALKOHOLIJUOMIEN TODELLISEN ALKOHOLIPITOISUUDEN MÄÄRITYS TILAVUUSPROSENTTINA — MÄÄRITYS ELEKTRONISELLA TIHEYSMITTARILLA (NÄYTTEEN RESONANSSIVÄRÄHTELYTAAJUUDEN PERUSTEELLA VÄRÄHTELYKENNOSSA)

B.1 **Periaate**

Nesteen tiheys määritetään mittaamalla värähtelevän U-putken oskillointi elektronisesti. Tämän määrityksen suorittamiseksi näyte lisätään värähtelyjärjestelmään, jonka ominaisvärähtelytaajuutta lisätty massa tällöin muuttaa.

B.2 **Reagenssit ja materiaalit**

Ellei toisin mainita, analyysissä käytetään vain hyväksyttyä analyysilaatua olevia reagensseja ja vähintään kolmannen laatuluokan vettä standardin ISO 3696:1987 määritelmän mukaisesti.

B.2.1 Asetoni (CAS 666-52-4) tai absoluuttinen alkoholi

B.2.2 Kuiva ilma.

▼B

B.3 **Laitteet ja välineet**

Tavanomaiset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

B.3.1 Digitaalinäyttöinen tiheysmittari

Tällaisiin määrityksiin tarkoitetun elektronisen tiheysmittarin on ilmoitettava tiheys grammoina millilitraa kohti (g/ml) 5 desimaalia käsittävänä lukuna.

Huomautus 1: Tiheysmittari on asetettava täysin vakaalle jalustalle, joka on eristetty kaikkea värinää vastaan.

B.3.2 Lämpötilan säätö

Tiheysmittarin suoritus voidaan kelpuuttaa vain silloin kun määrityskenno on yhdistetty laitteen sisäiseen lämpötilan säätimeen, joka kykenee pitämään laitteen sisällä vakiolämpötilan vähintään ± 0,02 ºC:n tarkkuudella.

Huomautus 2: Määrityskennon lämpötilan tarkka asettaminen ja seuranta on tärkeää, sillä 0,1 ºC:n virhe voi johtaa suuruusluokaltaan jopa 0,1 kg/m^3:n tiheyden vaihteluun.

B.3.3 Näytteen injektioruiskut tai automaattinen näytteensyöttäjä.

B.4 **Suoritus**

B.4.1 Tiheysmittarin kalibrointi

Laite on kalibroitava laitteen valmistajan ohjeiden mukaisesti, kun se otetaan käyttöön ensimmäistä kertaa. Se on kalibroitava uudelleen säännöllisesti ja tarkistettava suhteessa varmennettuun vertailustandardiin tai varmennetun vertailustandardin kanssa kalibroituun laboratorion omaan vertailuliuokseen.

B.4.2 Näytteen tiheyden määrittäminen

B.4.2.1 Tarvittaessa kenno puhdistetaan ennen määritystä asetonilla tai absoluuttisella alkoholilla ja kuivataan kuivalla ilmalla. Kenno huuhdellaan näyteliuoksella.

B.4.2.2 Näyte injektoidaan kennoon (käyttäen ruiskua tai automaattista näytteensyöttäjää) siten, että kenno täyttyy kokonaan. Täytön aikana varmistetaan, että kennoon ei jää ilmakuplia. Näytteen on oltava homogeeninen, eikä se saa sisältää kiinteitä hiukkasia. Liettynyt aine on poistettava suodattamalla ennen analyysiä.

B.4.2.3 Kun lukema on vakiintunut, tiheysmittarin näytön ilmoittama tiheys ρ_{20} tai alkoholipitoisuus kirjataan.

B.4.3 Tulos

Käytettäessä tiheyttä ρ_{20} todellinen alkoholipitoisuus lasketaan seuraavassa mainitusta alkoholipitoisuustaulukosta:

Alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina 20 ºC:n lämpötilassa samassa lämpötilassa määritetyn vesi-alkoholiseoksen tiheyden funktiona saadaan kansainvälisestä taulukosta, jonka OIML on vahvistanut suosituksessaan nro 22.

B.5 **Menetelmän suoritusarvot (mittaustarkkuus)**

B.5.1 Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset

Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien [1] [2] mukaisesti.

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	16
Näytteiden lukumäärä	6

Näytteet	A	B	C	D	E	F
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	11	13	15	16	14	13
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	2	3	1	—	1	2

▼B

Näytteet	A	B	C	D	E	F
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	22	26	30	32	28	26
Keskiarvo ($\bar{x}$) til.-%	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), til-%	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Toistettavuusraja (r), til-%	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), til-%	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Uusittavuusraja (R), til-%	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Näytetyypit:
A Hedelmälikööri; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*)
B Brandy; rinnakkaiset sokkonäytteet
C Viski; rinnakkaiset sokkonäytteet
D Grappa; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*)
E Akvaviitti; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*)
F Rommi; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

MENETELMÄ C: TISLATTUJEN ALKOHOLIJUOMIEN TODELLISEN ALKOHOLIPITOISUUDEN MÄÄRITYS — MÄÄRITYS HYDROSTAATTISEEN VAAKAAN PERUSTUVALLA TIHEYSMITTARILLA

C.1 Periaate

Tislattujen alkoholijuomien alkoholipitoisuus voidaan määrittää hydrostaattiseen vaakaan perustuvalla tiheysmittarilla. Määritys perustuu Arkhimedeen lakiin, jonka mukaan nesteeseen upotettuun kappaleeseen kohdistuu nesteestä pystysuoraan ylöspäin vaikuttava noste, joka on kappaleen syrjäyttämän nestemäärän painon suuruinen.

C.2 Reagenssit ja materiaalit

Ellei toisin mainita, analyysissä käytetään vain hyväksyttyä analyysilaatua olevia reagensseja ja vähintään kolmannen laatuluokan vettä standardin ISO 3696:1987 määritelmän mukaisesti.

C.2.1 Uppokappaleen puhdistusliuos (natriumhydroksidi, 30-prosenttinen, paino/tilavuus)

Valmistettaessa 100 ml liuosta punnitaan 30 g natriumhydroksidia mittapulloon ja tilavuus täytetään 100 ml:ksi 96-prosenttisella etanolilla.

C.3 Laitteet ja välineet

Tavanomaiset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

C.3.1 Hydrostaattinen yksikuppivaaka, jonka tarkkuus on 1 mg.

C.3.2 Erityisesti vaa'assa käytettäväksi sopiva uppokappale, jonka tilavuus on vähintään 20 ml ja joka on ripustettu halkaisijaltaan enintään 0,1 mm:n paksuisella langalla.

C.3.3 Mittalasi, jossa on mittaviiva. Uppokappaleen on mahduttava kokonaan mittalasissa olevan merkin alapuolelle; ainoastaan uppokappaleen ripustuslanka saa rikkoa mitattavan nesteen pinnan. Mittalasin sisähalkaisijan on oltava ainakin 6 mm uppokappaleen sisähalkaisijaa suurempi.

C.3.4 Lämpömittari (tai lämpötila-anturi), jonka asteikolle on merkitty asteet ja asteen kymmenesosat välillä 10—40 ºC, kalibroituna 0,05 ºC:seen.

C.3.5 Tunnustetun sertifiointielimen hyväksymät punnukset.

▼B

Huomautus 1: Kaksikuppivaa'an käyttö on myös mahdollista; periaate on kuvattu asetuksen (ETY) N:o 2676/90 liitteen luvussa 1 ”Tiheys ja ominaispaino” (sivu 7).

C.4 **Suoritus**

Uppokappale ja mittalasi on puhdistettava aina määritysten välillä tislatulla vedellä, kuivattava pehmeällä laboratoriopaperilla, josta ei irtoa kuituja, ja huuhdeltava liuoksella, jonka tiheys on tarkoitus määrittää. Haihtumalla tapahtuvan alkoholihäviön rajoittamiseksi määritykset on suoritettava heti kun laite on saavuttanut stabiilin tilan.

C.4.1 Vaa'an kalibrointi

Vaikka vaa'oilla on yleensä sisäinen kalibrointijärjestelmä, hydrostaattinen vaaka on voitava kalibroida punnuksilla, jotka ovat virallisen sertifiointielimen tarkastamia.

C.4.2 Uppokappaleen kalibrointi

C.4.2.1 Mittalasi täytetään merkkiin asti kahteen kertaan tislatulla vedellä (tai vastaavalla yhtä puhtaalla vedellä, esimerkiksi mikrosuodatetulla vedellä, jonka johtokyky on 18,2 MΩ / cm) 15—25 ºC:n lämpötilassa, mieluiten lämpötilassa 20 ºC.

C.4.2.2 Uppokappale ja lämpömittari upotetaan nesteeseen. Nestettä sekoitetaan, nesteen tiheys luetaan laitteen näytöstä ja saatua tiheyttä korjataan tarvittaessa siten, että tiheys vastaa veden tiheyttä määrityslämpötilassa.

C.4.3 Tarkistus vesi-alkoholiliuoksella

C.4.3.1 Mittalasi täytetään merkkiin asti vesi-alkoholiseoksella, jonka alkoholipitoisuus tunnetaan. Mainitun vesi-alkoholiseoksen lämpötila on 15—25 ºC, mieluiten 20 ºC.

C.4.3.2 Uppokappale ja lämpömittari upotetaan nesteeseen. Nestettä sekoitetaan ja nesteen tiheys (tai alkoholipitoisuus, mikäli mahdollista) luetaan laitteen näytöstä. Näin todetun alkoholipitoisuuden tulee olla sama kuin nesteen aiemmin määritetty alkoholipitoisuus.

Huomautus 2: Tätä liuosta, jonka alkoholipitoisuus tunnetaan, voidaan käyttää myös uppokappaleen kalibroimiseksi sen sijaan, että käytettäisiin kahteen kertaan tislattua vettä.

C.4.4 Tisleen tiheyden määrittäminen (tai sen alkoholipitoisuuden määrittäminen, mikäli mahdollista).

C.4.4.1 Tutkittavaa näytettä kaadetaan mittalasiin asteikon merkkiin asti.

C.4.4.2 Uppokappale ja lämpömittari upotetaan nesteeseen. Nestettä sekoitetaan ja nesteen tiheys (tai alkoholipitoisuus, mikäli mahdollista) luetaan laitteen näytöstä. Lämpötila on kirjattava, jos tiheys määritetään lämpötilassa t ºC (ρ_t).

C.4.4.3 Korjataan ρ_t-arvo ρ_{20}-arvoksi käyttäen taulukkoa, josta ilmenevät vesi-alkoholiseosten tiheydet ρT (Kansainvälisen viinijärjestön analyysimenetelmiä koskevan käsikirjan, 1994, liitteen II taulukko II, sivut 17—29).

C.4.5 Uppokappaleen ja mittalasin puhdistaminen

C.4.5.1 Uppokappale upotetaan sille tarkoitettuun puhdistusliuokseen mittalasissa.

C.4.5.2 Uppokappaleen annetaan liota yhden tunnin ajan pyörittäen sitä ajoittain.

C.4.5.3 Uppokappale huuhdellaan ensin runsaalla määrällä vesijohtovettä ja sen jälkeen tislatulla vedellä.

C.4.5.4 Uppokappale kuivataan pehmeällä laboratoriopaperilla, josta ei irtoa kuituja.

Näin on meneteltävä käytettäessä uppokappaletta ensimmäistä kertaa ja sen jälkeen säännöllisesti tarpeen mukaan.

C.4.6 Tulos

Tiheydestä ρ_{20} lasketaan todellinen alkoholipitoisuus käyttäen seuraavassa nimettyä alkoholipitoisuustaulukkoa:

Alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina 20 ºC:n lämpötilassa samassa lämpötilassa määritetyn vesi-alkoholiseoksen tiheyden funktiona saadaan kansainvälisestä taulukosta, jonka OIML on hyväksynyt suosituksessaan nro 22.

▼B

C.5 **Menetelmän suoritusarvot (täsmällisyys)**

C.5.1 Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset

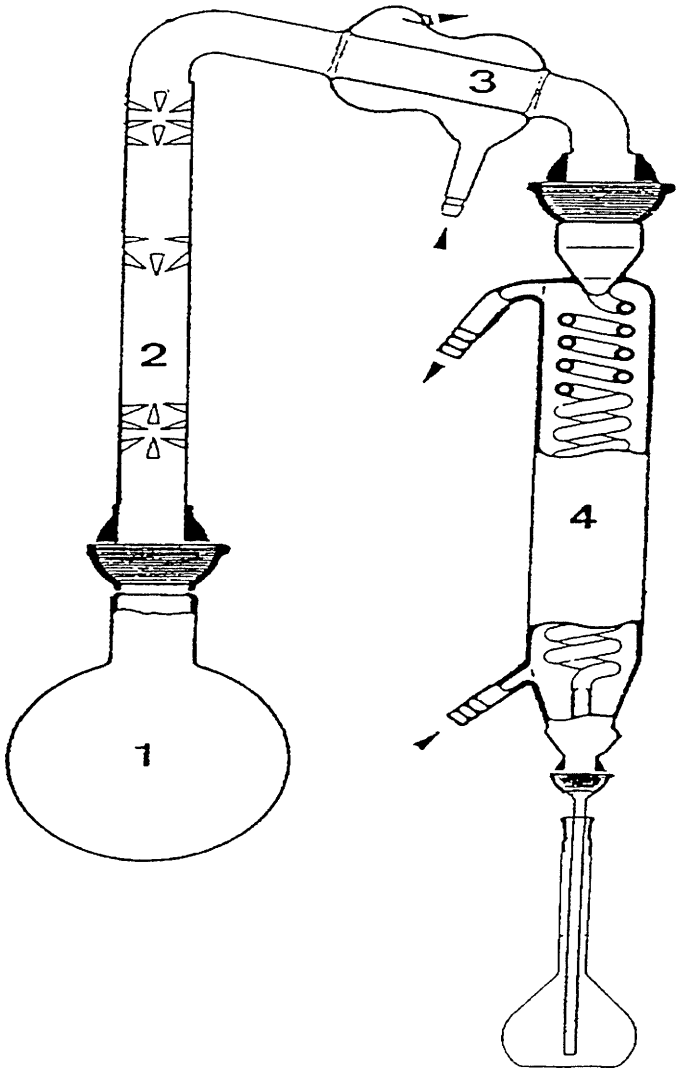
Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien [1] [2] mukaisesti.

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	12
Näytteiden lukumäärä	6

Näytteet	A	B	C	D	E	F
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	12	10	11	12	11	9
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	—	2	1	—	1	2
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	24	20	22	24	22	18
Keskiarvo ($\bar{x}$) til.-%	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), til-%	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Toistettavuusraja (r), til-%	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), til-%	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Uusittavuusraja (R), til-%	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Näytetyypit:
A Hedelmäliköori; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*)
B Brandy; rinnakkaiset sokkonäytteet
C Viski; rinnakkaiset sokkonäytteet
D Grappa; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäyttet (*)
E Akvaviitti; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*)
F Rommi; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

▼B



Kuva 1. Tislauslaite tislattujen alkoholijuomien todellisen alkoholipitoisuuden määrittämiseksi tilavuusprosenttina

1. Vakiopallohioksella varustettu pyörökolvi, jonka tilavuus on 1 litra.
2. 20 cm:n Vigreux-väkevöimiskolonni.
3. 10 cm:n pituinen suorareunainen West-jäähdytin.
4. 40 cm:n jäähdytyskierukka.

▼B

II KUIVA-AINEEN KOKONAISMÄÄRÄN GRAVIMETRINEN MÄÄRITYS

1 Soveltamisala

Asetuksessa (ETY) N:o 1576/89 säädetään tämän menetelmän käyttö vain akvaviitille, jonka kuiva-ainepitoisuus on rajoitettu 15 g:aan litraa kohti.

2 Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin

ISO 3696:1987: Analyyttiseen käyttöön tarkoitettu vesi — Laatuvaatimukset ja testimenetelmät

3 Määritelmä

Kuiva-aineen kokonaismäärään sisältyy kaikki sellainen aine, joka ei haihdu tietyissä fysikaalisissa olosuhteissa.

4 Periaate

Punnitaan jäännös, joka saadaan, kun tislattu alkoholijuoma on haihdutettu kuiviin kiehuvalla vesihauteella ja kuivattu kuivausuunissa.

5 Laitteet ja välineet

5.1 Tasapohjainen lieriömäinen haihdutusmalja, jonka halkaisija on 55 mm

5.2 Kiehuva vesihaude

5.3 25 ml:n pipetti, luokka A

5.4 Kuivausuuni

5.5 Eksikkaattori

5.6 Analyysivaaka, jonka tarkkuus on 0,1 mg.

6 Näytteenotto ja näytteet

Näytteet varastoidaan huoneenlämpötilassa ennen analyysiä.

7 Suoritus

7.1 Pipetoidaan 25 ml tislattua alkoholijuomaa, joka sisältää vähemmän kuin 15 g/l kuiva-ainetta, punnittuun, tasapohjaiseen lieriömäiseen haihdutusmaljaan, jonka sisähalkaisija on 55 mm. Haihduttamisen ensimmäisen tunnin ajan haihdutusmaljaa pidetään kiehuvan vesihauteen kannella siten että neste ei kiehu, koska kiehuminen voisi johtaa häviöihin nesteen roiskumisen seurauksena. Sitten haihdutusmalja jätetään vielä yhden tunnin ajaksi suoraan kosketukseen kiehuvan vesihauteen höyryn kanssa.

7.2 Kuivaaminen suoritetaan loppuun asettamalla haihdutusmalja kuivausuuniin 105 ºC ± 3 ºC:n lämpötilaan kahden tunnin ajaksi. Sitten haihdutusmaljan annetaan jäähtyä eksikkaattorissa, minkä jälkeen haihdutusmalja ja sen sisältö punnitaan.

8 Laskutoimitus

Jäännöksen massa kerrottuna luvulla 40 vastaa tislatun alkoholijuoman sisältämää kuiva-aineen määrää. Tämä arvo on ilmoitettava grammoina litraa kohti (g/l) yhden desimaalin tarkkuudella.

9 Menetelmän suoritusarvot (mittaustarkkuus)

9.1 Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset

Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien [1] [2] mukaisesti.

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	10
Näytteiden lukumäärä	4

▼B

Näytteet	A	B	C	D
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	9	9	8	9
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	1	1	2	—
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	18	18	16	18
Keskiarvo ($\bar{x}$) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Toistettavuuden keskihajonta (s_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Toistettavuusraja (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Uusittavuuden keskihajonta (s_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Uusittavuusraja (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Näytetyypit:
A Brandy; rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Rommi; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet.
C Grappa; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet.
D Akvaviitti; eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet.

▼B

III HAIHTUVIEN AINEIDEN JA METANOLIN MÄÄRITYS

III.1 YLEISET HUOMAUTUKSET

1 **Määritelmät**

Direktiivissä (ETY) N:o 1576/89 asetetaan etanolia ja metanolia lukuun ottamatta haihtuvien yhdisteiden vähimmäispitoisuudet tietylle tislattujen alkoholijuomien ryhmälle (rommi, viinirypäleistä peräisin olevat tislatut alkoholijuomat, tislatut hedelmäalkoholit ja niin edelleen). Tässä juomaryhmässä näiden pitoisuuksien on katsottu olevan perinteisesti seuraavassa lueteltujen aineiden konsentraatioiden summa:

1. haihtuvat hapot, jotka on ilmoitettu etikkahappona;
2. aldehydit, jotka on ilmoitettu etanaalina, johon sisältyy etanaali (asetaldehydi) ja 1,1-dietoksietaaniin (asetaaliin) sisältyvä etanaalifraktio;
3. seuraavat korkeammat alkoholit: 1-propanoli, 1-butanoli, 2-butanoli, 2-metyyli-1-propanoli, jotka on määritetty yksittäisinä alkoholeina, ja 2-metyyli-1-butanoli ja 3-metyyli-1-butanoli, jotka on määritetty yksittäisinä alkoholeina tai näiden kahden alkoholin summana;
4. etyyliasetaatti.

Seuraavat menetelmät ovat haihtuvien yhdisteiden määrittämiseen tarkoitettuja perinteisiä menetelmiä:

— haihtuvien happojen määrittäminen,

— aldehydien (etanaalin ja asetaalin), etyyliasetaatin ja alkoholien määrittäminen kaasukromatografialla.

2 **Haihtuvien yhdisteiden kaasukromatografinen analyysi**

Muiden kuin edellä mainittujen haihtuvien yhdisteiden kaasukromatografiset analyysit saattavat osoittautua erityisen kiinnostaviksi sekä tislauksessa käytetyn raaka-aineen alkuperän että tislauksen todellisten olosuhteiden määrittämiseksi.

Jotkut tislatut alkoholijuomat sisältävät muita haihtuvia aineosia, kuten aromaattisia yhdisteitä, jotka ovat tunnusomaisia alkoholin valmistuksessa käytetyille raaka-aineille, tislatun alkoholijuoman aromiaineille ja tislatun alkoholijuoman valmistukseen liittyville erityispiirteille. Nämä yhdisteet ovat tärkeitä asetuksessa (ETY) N:o 1576/89 säädettyjen vaatimusten arvioimiseksi.

III.2 TISLATUISSA ALKOHOLIJUOMISSA ESIINTYVIEN HAIHTUVIEN AROMIYHDISTEIDEN KAASUKROMATOGRAFINEN MÄÄRITTÄMINEN

1 **Soveltamisala**

Tämä menetelmä soveltuu käytettäväksi tislatuissa alkoholijuomissa esiintyvien 1,1-dietoksietaanin (asetaalin), 2-metyyli-1-butanolin (amyylialkoholin), 3-metyyli-1-butanolin (isoamyylialkoholin), metanolin (metyylialkoholin), etyylietanoaatin (etyyliasetaatin), 1-butanolin (n-butanolin), 2-butanolin (sek-butanolin), 2-metyyli-1-propanolin (isobutyylialkoholin), 1-propanolin (n-propanolin) ja etanaalin (asetaldehydin) kaasukromatografiseen määrittämiseen. Menetelmässä käytetään sisäistä standardia, esimerkiksi 3-pentanolia. Analyyttien konsentraatiot ilmoitetaan grammoina 100 litraa kohti absoluuttista alkoholia; tuotteen alkoholipitoisuus on määritettävä ennen analyysiä. Tislattuja alkoholijuomia, jotka voidaan analysoida tällä menetelmällä, ovat viski, brandy, rommi, viinistä tislattu alkoholi, hedelmistä tislattu alkoholi ja rypäleiden puristusjätteestä tislattu alkoholi.

2 **Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin**

ISO 3696:1987: Analyyttiseen käyttöön tarkoitettu vesi — Laatuvaatimukset ja testimenetelmät.

3 **Määritelmä**

Haihtuvat aromiyhdisteet ovat haihtuvia yhdisteitä, joita muodostuu etanolin ohella tislattujen alkoholijuomien käymisen, tislauksen ja kypsyttämisen aikana.

▼B

4 **Periaate**

Tislattujen alkoholijuomien haihtuvat aromiyhdisteet määritetään injektoimalla alkoholijuomaa tai sopivasti laimennettua alkoholijuomaa suoraan kaasukromatografiajärjestelmään. Alkoholijuomaan lisätään sopiva sisäinen standardi ennen ruiskuttamista. Yhdisteet erotetaan lämpötilaohjelmoinnin avulla sopivassa kolonnissa ja ne havaitaan liekki-ionisaatiodetektorilla (FID). Kunkin yhdisteen konsentraatio määritetään suhteessa sisäiseen standardiin niiden vastetekijöiden avulla, jotka on saatu kalibroinnissa ennalta määrätyissä kromatografisissa olosuhteissa, joiden on oltava samanlaiset kuin kyseisen alkoholijuoman kromatografiaolosuhteet.

5 **Reagenssit ja materiaalit**

Ellei toisin mainita, käytetään vain ISO-akkreditoidulta tavarantoimittajalta hankittuja reagensseja, joilla on puhtaustodistus, joiden puhtaus on yli 97 prosenttia ja jotka eivät sisällä muita haihtuvia aromiyhdisteitä, kun niitä käytetään kokeen vaatimassa laimennuksessa (tämä voidaan varmistaa injisoimalla yksittäiset aromiyhdisteiden standardit kokeessa käytettävinä laimennuksina kohdassa 6.4 esitetyissä kaasukromatografiaolosuhteissa), ja vain vähintään kolmannen laatuluokan vettä standardin ISO 3696 määritelmän mukaisesti. Asetaali ja asetaldehydi on säilytettävä pimeässä < 5 ºC:n lämpötilassa. Kaikkia muita reagensseja voidaan säilyttää huoneenlämpötilassa.

5.1 Absoluuttinen etanoli (CAS 64-17-5)

5.2 Metanoli (CAS 67-56-1)

5.3 1-propanoli (CAS 71-23-8)

5.4 2-metyyli-1-propanoli (CAS 78-33-1)

5.5 Sopivia sisäisiä standardeja, joita voidaan käyttää, ovat 3-pentanoli (CAS 584-02-1), 1-pentanoli (CAS 71-41-0), 4-metyyli-1-pentanoli (CAS 626-89-1) tai metyylinonanoaatti (CAS 1731-84-6).

5.6 2-metyyli-1-butanoli (CAS 137-32-6)

5.7 3-metyyli-1-butanoli (CAS 123-51-3)

5.8 Etyyliasetaatti (CAS 141-78-6)

5.9 1-butanoli (CAS 71-36-3)

5.10 2-butanoli (CAS 78-92-2)

5.11 Asetaldehydi (CAS 75-07-0)

5.12 Asetaali (CAS 105-57-7)

5.13 40-prosenttinen (tilavuus/tilavuus) etanoliliuos

Kun valmistetaan liuos, jonka etanolikonsentraatio on 400 ml/l, kaadetaan 400 ml etanolia (5.1) 1 litran mittapulloon, tilavuus saatetaan 1 litraan tislatulla vedellä ja pullon sisältö sekoitetaan perusteellisesti.

5.14 Standardiliuosten valmistus ja säilytys (validoidussa menetelmässä käytetty menettely)

Standardiliuoksia on säilytettävä < 5 ºC:n lämpötilassa ja ne on valmistettava uudelleen kuukausittain. Yhdisteiden ja liuosten massat on kirjattava 0,1 mg:n tarkkuudella.

5.14.1 Standardiliuos — A

Pipetoidaan jäljempänä luetellut reagenssit 100 ml:n mittapulloon, joka sisältää noin 60 ml etanoliliuosta (5.13) yhdisteiden haihtumisen välttämiseksi. Tilavuus saatetaan etanoliliuoksella (5.13) 100 ml:aan ja pullon sisältö sekoitetaan perusteellisesti. Pullon paino, kunkin lisätyn aineen paino ja sisällön lopullinen kokonaispaino kirjataan.

Yhdiste	Tilavuus (ml)
Metanoli (5.2)	3,0
1-propanoli (5.3)	3,0
2-metyyli-1-propanoli (5.4)	3,0
2-metyyli-1-butanoli (5.6)	3,0
3-metyyli-1-butanoli (5.7)	3,0
Etyyliasetaati (5.8)	3,0
1-butanoli (5.9)	3,0

▼B

Yhdiste	Tilavuus (ml)
2-butanoli (5.10)	3,0
Asetaldehydi (5.11)	3,0
Asetaali (5.12)	3,0

Huomautus 1 Asetaali ja asetaldehydi kannattaa lisätä viimeiseksi haihtumisesta aiheutuvien häviöiden pienentämiseksi.

5.14.2 Standardiliuos — B

Pipetoidaan 3 ml 3-pentanolia tai muuta sopivaa sisäistä standardia (5.5) 100 ml:n mittapulloon, joka sisältää noin 80 ml etanoliliuosta (5.13), tilavuus saatetaan etanoliliuoksella (5.13) 100 ml:aan ja pullon sisältö sekoitetaan perusteellisesti.

Pullon paino, 3-pentanolin tai muun lisätyn sisäisen standardin paino ja pullon sisällön lopullinen kokonaispaino kirjataan.

5.14.3 Standardiliuos — C

Pipetoidaan 1 ml liuosta A (5.14.1) ja 1 ml liuosta B (5.14.2) 100 ml:n mittapulloon, joka sisältää noin 80 ml etanoliliuosta (5.13), tilavuus saatetaan etanoliliuoksella (5.13) 100 ml:aan ja pullon sisältö sekoitetaan perusteellisesti.

Pullon paino, jokaisen lisätyn aineosan paino ja pullon sisällön lopullinen kokonaispaino kirjataan.

5.14.4 Standardiliuos — D

Valmistetaan laadunvalvontastandardi käyttäen aikaisemmin valmistettua standardia A (5.14.1). Pipetoidaan 1 ml liuosta A (5.14.1) 100 ml:n mittapulloon, joka sisältää noin 80 ml etanoliliuosta (5.13). Tilavuus saatetaan etanoliliuoksella (5.13) 100 ml:aan ja pullon sisältö sekoitetaan perusteellisesti.

Pullon paino, jokaisen lisätyn aineosan paino ja pullon sisällön lopullinen kokonaispaino kirjataan.

5.14.5 Standardiliuos — E

Pipetoidaan 10 ml liuosta B (5.14.2) 100 ml:n mittapulloon, joka sisältää noin 80 ml etanoliliuosta (5.13). Tilavuus saatetaan etanoliliuoksella (5.13) 100 ml:aan ja pullon sisältö sekoitetaan perusteellisesti.

Pullon paino, jokaisen lisätyn aineosan paino ja pullon sisällön lopullinen kokonaispaino kirjataan.

5.14.6 Liekki-ionisaatiodetektorin (FID) vasteen lineaarisuuden tarkistamiseksi käytetyt standardiliuokset

Pipetoidaan erillisiin 100 ml:n mittapulloihin, jotka sisältävät noin 80 ml etanolia (5.13), 0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 ml liuosta A (5.14.1) ja 1 ml liuosta B (5.14.2). Tilavuus saatetaan etanoliliuoksella (5.13) 100 ml:aan ja pullojen sisältö sekoitetaan perusteellisesti.

Pullon paino, jokaisen lisätyn aineosan paino ja pullon sisällön lopullinen kokonaispaino kirjataan.

5.14.7 Laadunvalvontastandardi

Pipetoidaan 9 ml standardiliuosta D (5.14.4) ja 1 ml standardiliuosta E (5.14.5) punnituspulloon ja sekoitetaan perusteellisesti.

Pullon paino, jokaisen lisätyn aineosan paino ja pullon sisällön lopullinen kokonaispaino kirjataan.

6 **Laitteet ja välineet**

6.1 Laite, jolla voidaan määrittää tiheys ja alkoholipitoisuus.

6.2 Analyysivaaka, jonka tarkkuus on neljä desimaalia.

6.3 Lämpötilaohjelmoitu kaasukromatografi, joka on varustettu liekki-ionisaatiodetektorilla ja integraattorilla tai muulla tietojenkäsittelyjärjestelmällä, jolla voidaan määrittää piikin ala tai piikin korkeus.

6.4 Kaasukromatografiakolonni (-kolonnit), joka erottaa analyytit siten että yksittäisten yhdisteiden (muiden kuin 2-metyyli-1-butanolin ja 3-metyyli-1-butanolin) välinen minimiresoluutio on vähintään 1,3.

▼B

Huomautus 2: Seuraavat kolonnit ja kaasukromatografiset olosuhteet ovat esimerkkejä, jotka sopivat tähän määritykseen:

1. Stationäärifaasiton esikolonni, pituus 1 m ja sisähalkaisija 0,32 mm, kytkettynä CP-WAX 57 CB -kolonniin, pituus 50 m ja sisähalkaisija 0,32 mm, faasin paksuus 0,2 µm (stabiloitu polyeteeniglykoli), sen jälkeen Carbowax 400 -kolonni, pituus 50 m ja sisähalkaisija 0,32 mm, faasin paksuus 0,2 µm. (Kolonnit on liitetty press fit -liittimillä).

Kantajakaasu ja paine:	Helium (135 kPa)
Kolonnin lämpötilaohjelmointi:	17 minuuttia 35 ºC, 12 ºC/minuutti, kunnes saavutetaan 70 ºC, 25 minuuttia 70 ºC.
Injektorin lämpötila:	150 ºC
Detektorin lämpötila:	250 ºC
Injektiotilavuus:	1 µl, split-suhde 20 – 100:1

2. Stationäärifaasiton esikolonni, pituus 1 m ja sisähalkaisija 0,32 mm, kytkettynä CP-WAX 57 CB -kolonniin, pituus 50 m ja sisähalkaisija 0,32 mm, faasin paksuus 0,2 µm (stabiloitu polyeteeniglykoli). (Stationäärifaasiton esikolonni on liitetty press fit -liittimillä).

Kantajakaasu ja paine:	Helium (65 kPa)
Kolonnin lämpötilaohjelmointi:	10 minuuttia 35 ºC, 5 ºC/minuutti, kunnes saavutetaan 110 ºC, 30 ºC/minuutti, kunnes saavutetaan 190 ºC, 2 minuuttia 190 ºC.
Injektorin lämpötila:	260 ºC
Detektorin lämpötila:	300 ºC
Injektiotilavuus:	1 µl, split-suhde 55:1

3. Pakattu kolonni (5 % CW 20M, Carbopak B), pituus 2 m ja sisähalkaisija 2 mm.

Kolonnin lämpötilaohjelmointi:	4 minuuttia 65 ºC, 10 ºC/minuutti, kunnes saavutetaan 140 ºC, 5 minuuttia 140 ºC, 5 ºC/minuutti, kunnes saavutetaan 150 ºC, 3 minuuttia 150 ºC.
Injektorin lämpötila:	65 ºC
Detektorin lämpötila:	200 ºC
Injektiotilavuus:	1 µl

7 **Näytteenotto ja näytteet**

7.1 Laboratorionäyte

▼B

Näytteistä määritetään alkoholipitoisuus (6.1).

8 **Suoritus (validoidussa menetelmässä käytetty menettely)**

8.1 Tutkittava näyte

8.1.1 Punnitaan sopiva tiivis punnituspullo ja punnitustulos kirjataan.

8.1.2 Pipetoidaan 9 ml laboratorionäytettä pulloon ja punnitustulos kirjataan ($M_{NÄYTE}$).

8.1.3 Lisätään 1 ml standardiliuosta E (5.14.5) ja punnitustulos kirjataan (M_{IS}).

8.1.4 Näytettä ravistellaan voimakkaasti (näytettä käännellään ylösalaisin ainakin 20 kertaa). Ennen analyysiä näytteitä on säilytettävä alle 5 ºC:n lämpötilassa haihtuvien aineiden hävikin välttämiseksi.

8.2 Nollakoe

8.2.1 Punnitaan sopiva tiivis punnituspullo käyttämällä vaakaa, jonka tarkkuus on neljä desimaalia (6.2), ja punnitustulos kirjataan.

8.2.2 Pulloon pipetoidaan 9 ml etanoliliuosta, jonka konsentraatio on 400 ml/l (5.13), ja punnitustulos kirjataan.

8.2.3 Lisätään 1 ml standardiliuosta E (5.14.5) ja punnitustulos kirjataan.

8.2.4 Tutkittavaa ainetta ravistellaan voimakkaasti (näytettä käännellään ylösalaisin vähintään 20 kertaa). Ennen analyysiä näytteitä on säilytettävä alle 5 ºC:n lämpötilassa haihtuvien aineiden hävikin välttämiseksi.

8.3 Alustava koe

Kromatografiin injektoidaan standardiliuosta C (5.14.3), jonka avulla varmistetaan, että kromatografi erottaa analyytit vähintään erotuskyvyllä 1,3 (lukuun ottamatta 2-metyyli-1-butanolia ja 3-metyyli-1-butanolia).

8.4 Kalibrointi

Kalibrointi on tarkistettava seuraavasti. Varmistetaan, että vaste on lineaarinen, analysoimalla kolmesti peräkkäin sisäistä standardia (IS) sisältävät lineaarisuusstandardiliuokset (5.14.6). Jokaisen injektion osalta lasketaan integraattorin piikin aloista tai piikin korkeuksista kunkin yhdisteen R-suhde ja laaditaan graafinen esitys, joka esittää R:ää yhdisteen ja sisäisen standardin (IS) konsentraatioiden suhteen C funktiona. Tällöin tuloksena pitäisi olla suora, jonka korrelaatiokerroin on vähintään 0,99.

$$R = \frac{\text{Yhdisteen piikin ala tai korkeus}}{\text{Sisäisen standardin piikin ala tai korkeus}}$$

$$C = \frac{\text{Yhdisteen konsentraatio (µg/g)}}{\text{Sisäisen standardin konsentraatio (µg/g)}}$$

8.5 Määritys

Kromatografiin injektoidaan standardiliuosta C (5.14.3) ja kaksi kertaa laadunvalvontastandardia (5.14.7). Sen jälkeen injektoidaan analysoitavat näytteet (jotka on valmistettu kohtien 8.1 ja 8.2 mukaisesti) sisällyttäen yhden laadunvalvontastandardin joka 10. näytteen jälkeen määrityksen stabiilisuuden varmistamiseksi. Standardiliuosta C (5.14.3) injektoidaan joka 5. näytteen jälkeen.

9 **Laskutoimitus**

Automaattista tietojenkäsittelyjärjestelmää voidaan käyttää edellyttäen, että tiedot voidaan tarkistaa seuraavassa menetelmässä kuvattujen periaatteiden mukaisesti.

Mitataan yhdisteen ja sisäisen standardin piikin ala tai korkeus

9.1 Vastetekijän laskeminen.

Standardiliuoksen C (5.14.3) kromatogrammista lasketaan yhdisteiden vastetekijät käyttäen yhtälöä (1).

▼B

$$(1)\ \text{Vastetekijä} = \frac{\text{Sisäisen standardin piikin ala tai korkeus}}{\text{Yhdisteen piikin ala tai korkeus}} \times \frac{\text{Yhdisteen konsentraatio (µg/g)}}{\text{Sisäisen standardin konsentraatio (µg/g)}}$$

jossa:

Yhdisteen konsentraatio = Yhdisteen konsentraatio liuoksessa C (5.14.3)

Sisäisen standardin konsentraatio = sisäisen standardin konsentraatio liuoksessa C (5.14.3).

9.1.2 Näytteen analyysi

Lasketaan yhdisteiden konsentraatiot näytteissä seuraavan yhtälön (2) avulla.

$$(2)\ \text{Yhdisteen konsentraatio, (µg/g)} = \frac{\text{Yhdisteen piikin ala tai korkeus}}{\text{Sisäisen standardin piikin ala tai korkeus}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{M_{NÄYTE}\ (g)} \times \text{IS:n konsentraatio (µg/g)} \times \text{VT}$$

jossa:

$M_{NÄYTE}$ = näytteen paino (8.1.2);

M_{IS} = sisäisen standardin (IS) paino (8.1.3);

IS:n konsentraatio = sisäisen standardin konsentraatio liuoksessa E (5.14.5);

VT = vastetekijä, joka on laskettu yhtälön 1 mukaisesti.

9.1.3 Laadunvalvontastandardin analyysi

Lasketaan seuraavan yhtälön (3) mukaisesti laadunvalvontastandardin (5.14.7) sisältämien yhdisteiden saantoprosentit:

$$3)\ \text{Laadunvalvontanäytteen saantoprosentti} = \frac{\text{Analyytin konsentraatio laadunvalvontastandarissa}}{\text{Analyytin konsentraatio liuoksessa}} \times 100$$

Analyytin konsentraatio laadunvalvontastandardissa lasketaan edellä esitettyjen yhtälöiden (1) ja (2) mukaisesti.

9.2 Tulosten esittäminen

Konsentraatio, joka on ilmoitettu mikrogrammoina grammaa kohti (µg/g), muutetaan grammoiksi 100 litraa absoluuttista alkoholia kohti yhtälön (4) mukaisesti:

$$4)\ \text{Konsentraatio grammoina 100 litraa absoluuttista alkoholia kohti} = \text{Konsentraatio (µg / g)} \times \rho \times 10/(\text{alkoholipitoisuus tilavuusprosenttina} \times 1\ 000)$$

missä

ρ = tiheys, kg/m³

Tulokset esitetään kolmen merkitsevän numeron tarkkuudella käyttäen enintään yhtä desimaalia, esimerkiksi 11,4 grammaa alkoholia 100 litraa absoluuttista alkoholia kohti.

10 **Laadunvarmistus ja valvonta (käytetty validoidussa menetelmässä)**

Lasketaan edellä esitetyn yhtälön (2) mukaisesti yhdisteiden konsentraatio laadunvalvontastandardeissa, jotka on valmistettu noudattaen kohdissa 8.1.1—8.1.4 esitettyä menettelyä. Lasketaan yhtälön (3) mukaisesti saanto prosentteina. Jos yhdisteiden analyysitulokset poikkeavat enintään ± 10 prosenttia teoreettisista arvoista, määrityksiä voidaan jatkaa. Ellei näin ole, epätarkkuuteen johtaneet syyt tulee selvittää ja asiaankuuluvat parannukset tulee tehdä.

▼B

11 **Menetelmän suoritusarvot (mittaustarkkuus)**

Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset: Seuraavissa taulukoissa esitetään seuraavia yhdisteitä koskevat tulokset: etanoli, etyyliasetaatti, asetaali, etanolin kokonaismäärä, metanoli, 2-butanoli, 1-propanoli, 1-butanoli, 2-metyyli-1-propanoli, 2-metyyli-1-butanoli, 3-metyyli-1-butanoli.

Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien mukaisesti.

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	etanaali

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	28	26	27	27	28
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	2	4	3	3	2
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	56	52	54	54	56
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8 (*)	28,6 52,2 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Toistettavuusraja (r), µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Uusittavuusraja (R), µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	etyyliasetaatti

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	24	24	25	24	24
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	2	2	1	2	2
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	48	48	50	48	48
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)

▼B

Näytteet	A	B	C	D	E
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Toistettavuusraja (r), µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Uusittavuusraja (R), µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	asetaali

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	20	21	22	17	21
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	4	3	2	4	3
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	40	42	44	34	42
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60 (*)	15,1 28,3 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Toistettavuusraja (r), µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Uusittavuusraja (R), µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	kokonaisetanaali

▼B

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	23	19	22	21	22
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	1	5	2	3	2
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	46	38	44	42	44
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4	32,7
				15,8 (*)	61,8 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Toistettavuusraja (r), µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Uusittavuusraja (R), µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	metanoli

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	26	27	27	28	25
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	4	3	3	1	4
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	52	54	54	56	50
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0	18,6
				61,5 (*)	28,9 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Toistettavuusraja (r), µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Uusittavuusraja (R), µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

▼B

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	4
Analyytti	2-butanoli

Näytteet	A	B	C	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	21	27	29	22
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	4	3	1	3
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	42	54	58	44
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Toistettavuusraja (r), µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Uusittavuusraja (R), µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	1-propanoli

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	29	27	27	29	29
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	2	4	3	2	2
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	58	54	54	58	58
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Toistettavuusraja (r), µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1

▼B

Näytteet	A	B	C	D	E
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Uusittavuusraja (R), µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	1-butanoli

Näytteet	A	B	C
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	20	22	22
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	4	4	6
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	40	44	44
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	0,43	0,20	0,43
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	11,2	3,6	5,6
Toistettavuusraja (r), µg/g	1,1	0,6	1,2
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	0,59	0,55	0,82
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	15,7	9,8	10,8
Uusittavuusraja (R), µg/g	1,7	1,5	2,3

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	2-metyyli-1-propanoli

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	28	31	30	26	25
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	3	0	1	5	6
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	56	62	60	52	50
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8 (*)	133,87 (*)

▼B

Näytteet	A	B	C	D	E
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Toistettavuusraja (r), µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Uusittavuusraja (R), µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	2-metyyli-1-butanoli

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	25	26	25	27	25
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	3	2	3	1	2
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	50	52	50	54	50
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2 (*)	39,5 61,5 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Toistettavuusraja (r), µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Uusittavuusraja (R), µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

Laboratorioiden välisen testauksen suoritusvuosi	1997
Laboratorioiden lukumäärä	32
Näytteiden lukumäärä	5
Analyytti	3-metyyli-1-butanoli

▼B

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden lukumäärä, kun suuresti poikkeavia tuloksia saaneet laboratoriot on poistettu	23	23	24	27	21
Suuresti poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	5	5	4	1	6
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	46	46	48	54	42
Keskiarvo ($\bar{x}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Toistettavuuden keskihajonta (s_r), µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_r), (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Toistettavuusraja (r), µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Uusittavuuden keskihajonta (s_R), µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD_R), (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Uusittavuusraja (R), µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Näytetyypit:
A Brandy, rinnakkaiset sokkonäytteet.
B Kirsikkaviina, rinnakkaiset sokkonäytteet.
C Grappa, rinnakkaiset sokkonäytteet.
D Viski, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).
E Rommi, eri pitoisuuden omaavat rinnakkaisnäytteet (*).

▼M1

V ANETOLI. TISLATTUJEN ALKOHOLIJUOMIEN TRANS-ANETOLIN KAASUKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS

1 Soveltamisala

Tämä menetelmä soveltuu trans-anetolin määrittämiseen aniksella maustetuista tislatuista alkoholijuomista kapillaarikaasukromatografian avulla.

2 Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin

ISO 3696: 1987 Analyyttiseen laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi — Määritelmä ja testimenetelmät

3 Periaate

Tislatun alkoholijuoman trans-anetolikonsentraatio määritetään kaasukromatografisesti. Testattavaan näytteeseen ja konsentraatioltaan tunnettuun vertailuliuokseen lisätään sama määrä sisäistä standardia, esimerkiksi 4-allyylianisolia (estragolia), kun näytteessä ei ole luonnostaan estragolia. Molemmat liuokset laimennetaan 45 % vol etanoliliuoksella ja injektoidaan suoraan kaasukromatografiin. Runsaasti sokereita sisältävät likööorit on uutettava ennen näytteenvalmistusta ja analyysia.

4 Reagenssit ja materiaalit

Analyysissä käytettyjen reagenssien puhtausasteen on oltava vähintään 98 %. Analyysissä käytetään vain standardin ISO 3696 mukaista vähintään kolmannen laatuluokan vettä.

Vertailukemikaalit on säilytettävä kylmässä (noin 4 °C), pimeässä, alumiinisäiliöissä tai tummissa lasisissa reagenssipulloissa. Tulpissa käytetään mielellään alumiinitiivistettä. Trans-anetoli täytyy ”sulattaa” kiteisestä muodostaan ennen käyttöä, mutta tällöin sen lämpötila ei saa missään vaiheessa ylittää 35 °C:ta.

4.1 96 % vol etanoli (CAS 64-17-5)

4.2 1-metoksi-4-(1-propenyyli)bentseeni; (trans-anetoli) (CAS 4180-23-8)

4.3 4-allyylianisoli, (estragoli) (CAS 140-67-0), ehdotetaan käytettäväksi sisäisenä standardina

4.4 45 % vol etanoli

Lisätään 560 g tislattua vettä 378 g:aan 96 % vol etanolia.

4.5 Standardiliuosten valmistaminen

Standardiliuoksia säilytetään huoneenlämpötilassa (15–35 °C) pimeässä, alumiinisäiliöissä tai tummissa lasisissa reagenssipulloissa. Tulpassa on oltava mielellään alumiinitiiviste.

Trans-anetoli ja 4-allyylianisoli ovat käytännössä veteen liukenemattomia, ja sen vuoksi trans-anetoli ja 4-allyylianisoli täytyy liuottaa pieneen määrään 96 % vol etanolia (4.1) ennen 45 % vol etanolin (4.4) lisäämistä.

Varastoliuokset tulee valmistaa uudelleen aina viikon välein.

4.5.1 Standardiliuos A

Trans-anetolin varastoliuos (konsentraatio: 2 g/l)

Punnitaan 40 mg trans-anetolia (4.2) 20 ml:n mittapulloon (tai 400 mg 200 ml:n pulloon ja niin edelleen). Lisätään hieman 96 % vol etanolia (4.1) ja täytetään tilavuuteen 45 % vol etanolilla (4.4). Sekoitetaan perusteellisesti.

4.5.2 Sisäinen standardi, liuos B

Sisäisen standardin, esimerkiksi estragolin varastoliuos (konsentraatio: 2 g/l).

Punnitaan 40 mg estragolia (4.3) 20 ml:n mittapulloon (400 mg 200 ml:n pulloon ja niin edelleen). Lisätään hieman 96 % vol etanolia (4.1) ja täytetään tilavuuteen 45 % vol etanolilla (4.4). Sekoitetaan perusteellisesti.

▼M1

4.5.3 Liekki-ionisaatiodetektorin (FID) vasteen lineaarisuuden tarkistamiseksi käytettävät liuokset

Liekki-ionisaatiodetektorin vasteen lineaarisuus on tarkistettava konsentraatioalueella, joka vastaa tislattujen juomien anetolipitoisuutta 0 grammasta litrassa 2,5 grammaan litrassa. Analyysiä tehtäessä analysoitavien tislattujen alkoholijuomien näytteet laimennetaan kymmenkertaisesti (8.3). Menetelmässä kuvattuun analyysiin tarvittavat lineaarisuusstandardiliuokset, jotka vastaavat analysoitavan näytteen trans-anetolikonsentraatioita 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 ja 0,25 g/l, valmistetaan seuraavasti: otetaan 0,5, 1, 1,5, 2 ja 2,5 ml varastoliuosta A (4.5.1) ja pipetoidaan ne erillisiin 20 ml:n mittapulloihin. Pipetoidaan kuhunkin pulloon 2 ml sisäistä standardiliuosta B (4.5.2). Täytetään merkkiviivaan 45 % vol etanolilla (4.4) ja pullojen sisältö sekoitetaan perusteellisesti.

Nollaliuosta (8.4) käytetään 0 g/l -liuoksena.

4.5.4 Standardilious C

Pipetoidaan 2 ml standardiliuosta A (4.5.1) 20 ml:n mittapulloon. Lisätään 2 ml sisäistä standardia, liuosta B (4.5.2) ja täytetään merkkiin 45 % vol etanolilla (4.4). Sekoitetaan perusteellisesti.

5 Laitteet ja välineet

5.1 Kapillaarikaasukromatografi, jossa on liekki-ionisaatiodetektori (FID) ja integraattori tai muu tietojenkäsittelyjärjestelmä, jolla voidaan mitata piikkien korkeuksia tai pinta-aloja, sekä automaattinen näytteensyöttäjä tai näytteen manuaaliseen injektointiin tarvittavat laitteet.

5.2 Split/splitless-injektori

5.3 Kapillaarikolonni, joka voi olla esimerkiksi seuraavanlainen:

Pituus: 50 m,

Sisähalkaisija: 0,32 mm,

Faasin paksuus: 0,2 μm,

Stationäärifaasi: FFAP — silloitettu, huokoinen modifioitu TPA-polyetyleeniglykolipolymeeri.

5.4 Normaalit laboratoriolaitteet: A-luokan lasisia mittavälineitä, analyysivaaka (tarkkuus: ± 0,1 mg).

6 Kromatografian ajo-olosuhteet

Kolonnin tyypin ja dimensioiden sekä kaasukromatografin ajo-olosuhteiden tulee olla sellaiset, että anetoli ja sisäinen standardi erottuvat toisistaan ja mahdollisista mittausta häiritsevistä yhdisteistä. Esimerkissä 5.3 esitetyn kolonnin tyypilliset olosuhteet ovat seuraavat:

6.1 Kantajakaasu: helium, analyyttinen laatu

6.2 Virtausnopeus: 2 ml/min

6.3 Injektorin lämpötila: 250 ºC

6.4 Detektorin lämpötila: 250 ºC

6.5 Uunin lämpötilaolosuhteet: isoterminen, 180 ºC, ajoaika 10 minuuttia

6.6 Injektoitava määrä: 1μl, split 1:40.

7 Näytteet

Näytteet on säilytettävä huoneenlämpötilassa suojassa valolta ja kylmältä.

8 Mittauksen suoritus

8.1 Estragolin tutkiminen näytteestä

Jotta voidaan varmistua siitä, ettei näytteessä ole luonnostaan estragolia, näyte analysoidaan sisäistä standardia lisäämättä. Jos näytteessä on luonnostaan estragolia, täytyy valita jokin toinen sisäinen standardi (esimerkiksi mentoli).

Pipetoidaan 2 ml näytettä 20 ml:n mittapulloon ja tilavuus täytetään merkkiin 45 % vol etanolilla (4.4). Sekoitetaan perusteellisesti.

▼M1

8.2 Tutkittavien näytteiden valmistaminen

Pipetoidaan 2 ml näytettä 20 ml:n mittapulloon ja lisätään 2 ml sisäistä standardia, liuosta B (4.5.2). Täytetään merkkiin 45 % vol etanolilla (4.4) ja pullon sisältö sekoitetaan perusteellisesti.

8.3 Nollanäyte

Pipetoidaan 2 ml sisäistä standardia, liuosta B (4.5.2) 20 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin 45 % vol etanolilla (4.4). Sekoitetaan perusteellisesti.

8.4 Lineaarisuuden testaus

Ennen analyysin aloittamista tulee varmistaa liekki-ionisaatiodetektorin (FID) vasteen lineaarisuus analysoimalla peräkkäin kolme rinnakkaisnäytettä kustakin lineaarisuusstandardiliuoksesta (4.5.3).

Integraattorin piikkien pinta-alojen tai piikkien korkeuksien perusteella piirretään kuvaaja, jonka akseleina on standardin emoliuoksen konsentraatio (g/l) ja suhdeluku R.

R = trans-anetolipiikin korkeus tai pinta-ala jaettuna estragolipiikin korkeudella tai pinta-alalla.

Kuvaajan pitäisi olla lineaarinen.

8.5 Määrittäminen

Injektoidaan nollanäyte (8.3), sen jälkeen standardiliuos C (4.5.4), sen jälkeen yksi lineaarisuusstandardi (4.5.3), joka toimii laadunvalvontanäytteenä (se voidaan valita tutkittavan näytteen todennäköisen trans-anetolipitoisuuden mukaan), sitten viisi tutkittavaa näytettä (8.2). Jokaisen viiden tutkittavan näytteen jälkeen injektoidaan lineaarisuusnäyte (laadunvalvontanäyte) analyysin stabiiliuden varmistamiseksi.

9 **Vastekertoimen laskeminen**

Mitataan joko piikkien pinta-alat (integraattorin tai tietojenkäsittelyjärjestelmän avulla) tai piikkien korkeudet (manuaalinen määritys) trans-anetolin ja sisäisen standardin piikeille.

9.1 Vastekertoimen (RF_i) laskeminen

Vastekerroin lasketaan seuraavasti:

RFi = (Ci / pinta-ala tai korkeus i)*(pinta-ala tai korkeus is / Cis)

missä:

C_i on trans-anetolin konsentraatio standardiliuos A:ssa (4.5.1)

C_{is} on sisäisen standardin konsentraatio standardiliuos B:ssä (4.5.2)

pinta-ala $_i$ on trans-anetolin piikin pinta-ala (tai korkeus)

pinta-ala $_{is}$ on sisäisen standardin piikin pinta-ala (tai korkeus)

RF_i lasketaan standardiliuoksen C (4.5.4) viidestä rinnakkaismäärityksestä.

9.2 Vasteen lineaarisuuden tutkimiseen käytettävien lineaarisuusstandardien analysointi

Injektoidaan lineaarisuusstandardiliuokset (4.5.3).

9.3 Näytteen analysointi

Injektoidaan tutkittava näyteliuos (8.2).

10 **Tulosten laskeminen**

Trans-anetolin konsentraatio lasketaan seuraavasta kaavasta:

ci = Cis * (pinta-ala tai korkeusi / pinta-ala tai korkeusis)*RFi

missä:

c_i on tutkittavan näytteen trans-anetolikonsentraatio

C_{is} on sisäisen standardin konsentraatio standardiliuos B:ssä (4.5.2)

Pinta-ala tai korkeus$_i$ on trans-anetolin piikin pinta-ala tai korkeus

▼M1

Pinta-ala tai korkeus$_{is}$	on sisäisen standardin piikin pinta-ala tai korkeus
RF_i	on vastekerroin (laskettu kohdan 9.1 mukaisesti)

Trans-anetolikonsentraatio ilmoitetaan grammoina litrassa yhden desimaalin tarkkuudella.

11 **Laadunvarmistus ja laadunvalvonta**

Kromatogrammien tulee olla sellaiset, että anetoli ja sisäinen standardi erottuvat toisistaan ja mahdollisista mittausta häiritsevistä yhdisteistä. RF_i-arvo lasketaan standardiliuoksen C (4.5.4) viidestä rinnakkaismäärityksestä. Jos variaatiokerroin (CV % = (keskihajonta/keskiarvo)*100)) on välillä ± 1 %, RF_i:n keskiarvo hyväksytään.

Edellä olevaa laskutoimitusta on käytettävä laadunvalvontanäytteen trans-anetolin konsentraation laskemiseen.

Jos laadunvalvontanäytteen tuloksista laskettu keskiarvo poikkeaa vähemmän kuin ± 2,5 % sen teoreettisesta arvosta, tutkittavien näytteiden tulokset voidaan hyväksyä.

12 **Runsaasti sokeria sisältävän alkoholinäytteen ja liköörinäytteen käsittely ennen kaasukromatografianalyysiä**

Alkoholi on uutettava runsaasti sokeria sisältävästä alkoholipitoisesta juomasta, jotta trans-anetolikonsentraatio voidaan analysoida kapillaarikaasukromatografisesti.

12.1 Periaate

Otetaan liköörinäytteestä määräosuus ja lisätään siihen sisäinen standardi, jonka pitoisuus on samaa suuruusluokkaa kuin trans-anetolin pitoisuus liköörissä. Näytteeseen lisätään natriumfosfaatin dodekahydraattia ja vedetöntä ammoniumsulfaattia. Saatu seos ravistetaan hyvin ja jäähdytetään, jolloin syntyy kaksi kerrosta. Näistä ylempi, alkoholikerros, otetaan talteen. Tästä alkoholikerroksesta otetaan määräosuus, joka laimennetaan 45 % vol etanolilla (4.4) (huomautus: tässä vaiheessa ei lisätä sisäistä standardia, koska se on jo lisätty). Saatu liuos analysoidaan kaasukromatografisesti.

12.2 Reagenssit ja materiaalit

Uutossa käytetään vain reagensseja, joiden puhtaus on vähintään 99 %.

12.2.1 Ammoniumsulfaatti, vedetön (CAS 7783-20-2)

12.2.2 Natriumfosfaatti, kaksiemäksinen, dodekahydraatti (CAS 10039-32-4)

12.3 Laitteet ja välineet

Erlenmeyerkolveja, jääkaappi.

12.4 Suoritus

12.4.1 Estragolin tutkiminen näytteestä

Jotta voidaan varmistua siitä, ettei näytteessä ole luonnostaan estragolia, tehdään nollauutto (12.4.2), jossa näyte analysoidaan ilman sisäistä standardia. Jos näytteessä on luonnostaan estragolia, täytyy valita jokin toinen sisäinen standardi.

12.4.2 Uutto

Pipetoidaan 5 ml 96 % vol etanolia (4.1) erlenmeyerkolviin, punnitaan samaan kolviin 50 mg sisäistä standardia (4.3) ja lisätään 50 ml näytettä. Lisätään 12 g vedetöntä ammoniumsulfaattia (12.2.1) ja 8,6 g kaksiemäksistä natriumfosfaatin dodekahydraattia (12.2.2). Suljetaan erlenmeyerkolvi tulpalla.

Ravistetaan kolvia vähintään 30 minuutin ajan. Mekaanista ravistuslaitetta voidaan käyttää, ei kuitenkaan teflonpinnoitettua magneettisauvaa, koska osa trans-anetolista imeytyy tefloniin. Huomaa, että liuokseen lisätyt suolat eivät liukene täysin.

Suljettu kolvi pannaan jääkaappiin ($T < 5$ °C) vähintään kahden tunnin ajaksi.

Tämän jälkeen pullossa pitää olla kaksi selvästi erillistä kerrosta ja kiinteä jäännös. Alkoholikerroksen tulee olla kirkas. Jos se ei ole kirkas, pullo pannaan takaisin jääkaappiin, kunnes kerrokset ovat erottuneet selvästi.

▼M1

Kun alkoholikerros on kirkas, otetaan siitä varovasti määräosuus (esimerkiksi 10 ml) ja varotaan koskemasta vesikerrokseen. Määräosuus pannaan tummaan pulloon, joka suljetaan huolella.

12.4.3 Analysoitavan uuttonäytteen valmistaminen

Uutteen (12.4.2) annetaan lämmetä huoneenlämpötilaan.

Otetaan 2 ml huoneenlämpötilaan temperoitua uutetta ja pipetoidaan se 20 ml:n mittapulloon. Täytetään merkkiin 45 % vol etanolilla (4.4) ja sekoitetaan huolellisesti.

12.5 Määrittäminen

Noudatetaan kohdassa 8.5 esitettyä menettelyä.

12.6 Tulosten laskeminen

Tulokset lasketaan seuraavan kaavan avulla:

Ci = (mis / V)* (pinta-alais / pinta-alais) *RFi

missä:

m_{is} on kohdassa (12.4.2) punnitun sisäisen standardin (4.3) määrä (mg)

V on tutkittavan näytteen tilavuus (50 ml)

RF_i on vastekerroin (9.1)

$pinta\text{-}ala_i$ on trans-anetolin piikin pinta-ala

$pinta\text{-}ala_{is}$ on sisäisen standardin piikin pinta-ala

Tulokset ilmoitetaan grammoina litrassa yhden desimaalin tarkkuudella.

12.7 Laadunvarmistus ja laadunvalvonta

Noudatetaan kohdassa 11 esitettyä menettelyä.

13 **Menetelmän suorituskykyä kuvaavat ominaisuudet (tarkkuus)**

Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset:

Seuraavissa taulukoissa on esitetty anetolia koskevat arvot.

Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien mukaisesti.

Laboratorioiden välinen testaus tehty vuonna	1998
Laboratorioiden määrä	16
Näytteiden määrä	10
Analyytti	anetoli

Pastis:

Näytteet	A	B	C	D	E	F
Laboratorioiden määrä, kun poikkeavan tuloksen saaneet laboratoriot on poistettu	15	15	15	13	16	16
Poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	1	1	1	3	—	—
Hyväksyttyjen tulosten määrä	30	30	30	26	16	16
Keskiarvo g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Toistettavuuden standardipoikkeama (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Toistettavuusraja (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Uusittavuuden standardipoikkeama (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4

▼**M1**

Näytteet	A	B	C	D	E	F
Uusittavuusraja (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Näytetyypit:

A pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

B pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

C pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

D pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

E pastis, yksittäinen näyte

F pastis, yksittäinen näyte

Muut aniksella maustetut tislatut alkoholijuomat:

Näytteet	G	H	I	J
Laboratorioiden määrä, kun poikkeavan tuloksen saaneet laboratoriot on poistettu	16	14	14	14
Poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	—	2	1	1
Hyväksyttyjen tulosten määrä	32	28	28	28
Keskiarvo g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Toistettavuuden standardipoikkeama (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Toistettavuusraja (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Uusittavuuden standardipoikkeama (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Uusittavuusraja (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Näytetyypit:

G ouzo, rinnakkaisnäytteet, joista toiseen on lisätty analyyttiä (*)

H anis, rinnakkaiset sokkonäytteet

I aniksella maustettu likööri, rinnakkaisnäytteet

J aniksella maustettu likööri, rinnakkaisnäytteet

▼M1

VI GLYSYRRITSIINIHAPPO. GLYSYRRITSIINIHAPON MÄÄRITTÄMINEN NESTEKROMATOGRAFISESTI

1 **Soveltamisala**

Tämä menetelmä soveltuu glysyrritsiinihapon määrittämiseen aniksella maustetuista tislatuista alkoholijuomista korkean suorituskyvyn nestekromatografian (HPLC) avulla. Neuvoston asetuksessa (ETY) N:o 1576/89 täsmennetään, että aniksella maustetun tislatun alkoholijuoman tulee sisältää glysyrritsiinihappoa vähintään 0,05 ja enintään 0,5 grammaa litrassa, jotta siitä voidaan käyttää nimitystä ”pastis”.

2 **Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin**

ISO 3696: 1987 Analyyttiseen laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi — Määritelmä ja testimenetelmät

3 **Periaate**

Glysyrritsiinihapon konsentraatio määritetään nestekromatografisesti (HPLC) UV-detektion avulla. Standardiliuos ja testattava näyte suodatetaan ja ne injektoidaan suoraan nestekromatografiin.

4 **Reagenssit ja materiaalit**

Analyysissä käytetään vain HPLC-laadun reagensseja, absoluuttista etanolia ja standardin ISO 3696 mukaista vähintään kolmannen laatuluokan vettä.

4.1 96 % vol etanoli (CAS 64-17-5)

4.2 Ammoniumglysyrritsinaatti, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (glysyrritsiinihapon ammoniumsuola)

(Molekyylipaino 839.98) (CAS 53956-04-0): puhtaus vähintään 90 %.

(glysyrritsiinihapon molekyylipaino 822,94)

4.3 Jääetikka, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.4 Metanoli, CH_3OH (CAS 67-56-1)

4.5 50 % vol etanoli

1 000 ml:aa varten (20 ºC):

— 96 % vol etanolia (4.1): 521 ml

— vettä (2.0): 511 ml.

4.6 HPLC-eluenttien valmistus.

4.6.1 Eluentti A (esimerkki)

80 tilavuusosaa vettä (2.0)

20 tilavuusosaa jääetikkaa (4.3).

Poistetaan kaasut eluentista viiden minuutin ajan.

Huomaa: Jos käytettävää vettä ei ole mikrosuodatettu, on suositeltavaa suodattaa valmistettu eluentti orgaanisten liuottimien suodattimella, jonka huokoskoko on 0,45 μm tai pienempi.

4.6.2 Eluentti B

Metanoli (4.4)

4.7 Standardiliuosten valmistaminen

Kaikki standardiliuokset täytyy uusia kahden kuukauden välein.

4.7.1 Vertailuliuos C

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 25 mg ammoniumglysyrritsinaattia (4.2) 100 ml:n mittapulloon. Lisätään hieman 50 % vol etanolia (4.5) ja liuotetaan ammoniumglysyrritsinaatti. Kun se on liuennut, täytetään pullo merkkiin asti 50 % vol etanolilla (4.5).

Suodatetaan orgaanisille liuottimille tarkoitetulla suodattimella.

4.7.2 Laitteiston vasteen lineaarisuuden tarkistamiseen käytettävät standardiliuokset

1,0 g/l varastoliuos valmistetaan punnitsemalla 0,1 mg:n tarkkuudella 100 g ammoniumglysyrritsinaattia 100 ml:n mittapulloon. Lisätään

▼M1

hieman 50 % vol etanolia (4.5) ja liuotetaan ammoniumglysyrritsinaatti. Kun se on liuennut, täytetään pullo merkkiin asti 50 % vol etanolilla (4.5).

Valmistetaan vähintään neljä muuta liuosta, jotka vastaavat 0,05, 0,1, 0,25 ja 0,5 g/l ammoniumglysyrritsinaattia, pipetoimalla 5 ml, 10 ml, 25 ml ja 50 ml 1,0 g/l:n varastoliuosta erillisiin 100 ml:n mittapulloihin. Täytetään pullo merkkiin asti 50 % vol etanolilla (4.5) ja sekoitetaan perusteellisesti.

Suodatetaan orgaanisille liuottimille tarkoitetulla suodattimella.

5 **Laitteet ja välineet**

5.1 Analyysilaitteisto

5.1.1 Nestekromatografi (HPLC)

5.1.2 Pumppujärjestelmä, jolla voidaan saavuttaa ja ylläpitää vakiomääräinen tai ohjelmoitu virtausnopeus erittäin tarkasti.

5.1.3 UV-detektori: asetetaan arvoon 254 nm.

5.1.4 Eluenttien kaasunpoistojärjestelmä:

5.2 Integraattori tai piirturi, jonka suorituskyky vastaa laitteiston muita osia.

5.3 Kolonni (esimerkki):

Materiaali: ruostumaton teräs tai lasi

Sisähalkaisija: 4—5 mm

Pituus: 100—250 mm

Stationäärifaasi: silloitettu silika (mieluiten pallomainen), jossa on funktionaalinen oktadekyyliryhmä (C18), maksimi hiukkaskoko: 5 μm.

5.4 Laboratoriolaitteet

5.4.1 Analyysivaaka, jonka tarkkuus on 0,1 mg

5.4.2 A-laadun lasisia mittavälineitä

5.4.3 Pienille tilavuuksille sopiva mikromembraanisuodatuslaitteisto

6 **Kromatografian ajo-olosuhteet**

6.1 Eluointiolosuhteet (esimerkki):

— Virtausnopeus: 1 ml/min
— Eluentti A = 30 %
— Eluentti B = 70 %

6.2 Detektio:

— UV = 254 nm

7 **Suoritus**

7.1 Alkoholijuomanäytteen valmistus.

Suodatetaan tarvittaessa orgaanisille liuottimille tarkoitetulla suodattimella (huokoskoko: 0,45 μm).

7.2 Määrittäminen

Kun kromatografin olosuhteet ovat stabiloituneet:

— injektoidaan 20 μl vertailuliuosta C (4.7.1),
— injektoidaan 20 μl näyteliuosta,
— verrataan kromatogrammeja keskenään. Tunnistetaan glysyrritsiinihapon piikit niiden retentioaikojen perusteella. Mitataan piikkien pinta-alat (tai korkeudet) ja lasketaan konsentraatio g/l kahden desimaalin tarkkuudella seuraavasta kaavasta:

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

missä:

c on glysyrritsiinihapon konsentraatio tutkittavassa alkoholijuomassa (g/l)

▼**M1**

C on ammoniumglysyrritsinaatin konsentraatio vertailuliuoksessa

h on glysyrritsiinihappopiikin pinta-ala (tai korkeus) tutkittavassa alkoholijuomassa

H on glysyrritsiinihappopiikin pinta-ala (tai korkeus) vertailuliuoksessa

P on vertailuaineena käytettävän ammoniumglysyrritsinaatin puhtausaste (%)

823 on glysyrritsiinihapon moolimassa

840 on ammoniumglysyrritsinaatin moolimassa.

8 **Menetelmän suorituskykyä kuvaavat ominaisuudet (tarkkuus)**

Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset:

seuraavassa taulukossa on esitetty glysyrritsiinihappoa koskevat arvot.

Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien mukaisesti.

Laboratorioiden välinen testaus tehty vuonna	1998
Laboratorioiden määrä	16
Näytteiden määrä	5
Analyytti	glysyrritsiinihappo

Näytteet	A	B	C	D	F
Laboratorioiden määrä, kun poikkeavan tuloksen saaneet laboratoriot on poistettu	13	14	15	16	16
Poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	3	2	1	—	—
Hyväksyttyjen tulosten määrä	26	28	30	32	32
Keskiarvo g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Toistettavuuden standardipoikkeama (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Toistetettavuusraja (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Uusittavuuden standardipoikkeama (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Uusittavuusraja (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Näytetyypit:

A pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

B pastis, rinnakkaisnäytteet, joista toiseen on lisätty analyyttiä (*)

C pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

D pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

E pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

▼M1

VII KALKONIT. PASTIKSEN KALKONIEN NESTEKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS

1 Soveltamisala

Tämän menetelmän avulla voidaan määrittää, onko aniksella maustetussa juomassa kalkoneita vai ei. Kalkonit ovat lakritsijuuressa *(Glycyrrhiza glabra)* luontaisesti esiintyviä, flavonoideihin kuuluvia väriaineita.

Jotta aniksella maustetusta tislatusta alkoholijuomasta voidaan käyttää nimitystä ”pastis”, sen tulee sisältää kalkoneita (asetus (ETY) N:o 1576/89).

2 Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin

ISO 3696: 1987 Analyyttiseen laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi — Määritelmä ja testimenetelmät

3 Periaate

Valmistetaan vertailuaineena käytettävä lakritsiuuteliuos. Kalkonien esiintyminen tai niiden puuttuminen määritetään nestekromatografisesti (HPLC) UV-detektion avulla.

4 Reagenssit ja materiaalit

Analyysissä on käytettävä vain HPLC-laadun reagensseja. Etanolin pitoisuuden tulee olla 96 % vol. Analyysissä käytetään vain standardin ISO 3696 mukaista vähintään kolmannen laatuluokan vettä.

4.1 96 % vol etanoli (CAS 64-17-5)

4.2 Asetonitriili, CH_3CN (CAS 75-05-8)

4.3 Vertailuaine: *Glycyrrhiza glabra* (lakritsijuuri)

Jauhetaan lakritsijuuri (*Glycyrrhiza glabra*) karkeaksi. Sauvamaisten partikkelien keskimääräiset dimensiot: pituus 10—15 mm, paksuus 1—3 mm.

4.4 Natriumasetaatti, CH_3COONa (CAS 127-09-3)

4.5 Jääetikka, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.6 Liuosten valmistaminen

4.6.1 50 % vol etanoli

1 000 ml:aa varten (20 ºC):

— 96 % vol etanolia (4.1): 521 ml

— vettä (2.0): 511 ml.

4.6.2 Eluentti A: asetonitriili

Asetonitriili (4.2), HPLC-laatu.

4.6.3. Eluentti B: 0,1 M natriumasetaattipuskuriliuos, pH 4,66

Punnitaan 8,203 g natriumasetaattia (4.4), lisätään 6,005 g jääetikkaa (4.5) ja täytetään tilavuus 1 000 ml:ksi vedellä (2) mittapullossa.

5 Referenssiuutteen valmistaminen *glycyrrhiza glabrasta* (4.3)

5.1 Punnitaan 10 g jauhettua lakritsijuurta (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) ja pannaan jauhe pyöreäpohjaiseen tislauskolviin.

— Lisätään 100 ml 50 % vol etanolia (4.6.1).

— Keitetään tunnin ajan palautusjäähdyttimen kanssa.

— Suodatetaan.

— Otetaan suodos talteen myöhempää käyttöä varten.

5.2 Otetaan lakritsiuute suodattimesta.

— Pannaan uute pyöreäpohjaiseen tislauskolviin.

— Lisätään 100 ml 50 % vol etanolia (4.6.1).

— Keitetään tunnin ajan palautusjäähdyttimen kanssa.

— Suodatetaan. Otetaan suodos talteen myöhempää käyttöä varten.

5.3 Lakritsijuuren uuttaminen täytyy tehdä kolme kertaa peräkkäin.

▼M1

5.4 Yhdistetään saadut kolme suodosta.

5.5 Haihduta yhdistettyjen suodosten (5.4) liuotinfaasi pyöröhaihduttimessa.

5.6 Liuota uutejäämä (5.5) 100 ml:aan 50 % vol etanolia (4.6.1).

6 **Laitteet ja välineet**

6.1 Analyysilaitteisto

6.1.1 Nestekromatografi (HPLC)

6.1.2 Pumppujärjestelmä, jolla voidaan saavuttaa ja ylläpitää vakiomääräinen tai ohjelmoitu virtausnopeus korkeassa paineessa

6.1.3 UV / näkyvän valon detektori, joka voidaan asettaa arvoille 254 ja 370 nm

6.1.4 Eluentin kaasunpoistojärjestelmä

6.1.5 Kolonniuuni, jonka lämpötilaksi voidaan asettaa 40 ± 0,1 ºC

6.2 Integraattori tai piirturi, jonka suorituskyky vastaa analyysilaitteiston muita osia

6.3 Kolonni

Materiaali: ruostumaton teräs tai lasi

Sisähalkaisija: 4—5 mm

Stationäärifaasi: silloitettu silika, jossa on funktionaalinen oktadekyyliryhmä (C18), hiukkaskoko: enintään 5 μm.

6.4 Normaalit laboratoriolaitteet, muun muassa seuraavat:

6.4.1 Analyysivaaka. (tarkkuus ± 0,1 mg)

6.4.2 Palautusjäähdyttimellä varustettu tislauslaitteisto, esimerkiksi:

— 250 ml:n pyörökolvi, jossa on lasihiosliitäntä,

— 30 cm pitkä palautusjäähdytin,

— lämmönlähde (sopivan järjestelyn avulla on vältettävä uutettavan aineen hajoaminen tai kiinnipalaminen).

6.4.3 Pyöröhaihdutin

6.4.4 Suodatuslaitteisto (esimerkiksi Büchner-suppilo)

6.5 Kromatografian ajo-olosuhteet (esimerkki)

6.5.1 Eluenttien A (4.6.2) ja B (4.6.3) gradienttiohjelma

— Ajetaan gradientti 20/80 (v/v):sta 50/50 (v/v):een 15 minuutin aikana.

— Ajetaan gradientti 50/50 (v/v):sta 75/25 (v/v):een 5 minuutin aikana.

— Ajetaan isograattisesti 75/25 (v/v) 5 minuutin ajan.

— Kolonnin annetaan stabiloitua injektointien välillä.

— Ajetaan isograattisesti 20/80 (v/v) 5 minuutin ajan.

6.5.2 Virtausnopeus: 1 ml/min

6.5.3 UV-detektorin asetukset:

Detektori tulee asettaa aallonpituudelle 370 nm, jotta voidaan havaita kalkonit, ja sen jälkeen aallonpituudelle 254 nm glysyrritsiinihapon havaitsemiseksi.

Huomaa: Aallonpituus tulee muuttaa (370 nm:sta 254 nm:iin) 30 s ennen kuin glysyrritsiinihapon piikki alkaa eluoitua.

7 **Mittauksen suoritus**

7.1 Alkoholijuomanäytteen valmistus

Suodatetaan orgaanisille liuottimille tarkoitetulla suodattimella (huokoskoko: 0,45 μm).

7.2. Lakritsin jäännösuutteen (5.6) laimentaminen

Laimennetaan ennen analyysiä yhteen kymmenesosaan 50 % vol alkoholilla (4.6.1).

▼M1

7.3 Määrittäminen

7.3.1 Injektoidaan 20 µl laimennettua lakritsiuutetta (7.2). Suoritetaan analyysi edellä kuvattuja kromatografiaolosuhteita käyttäen (6.5).

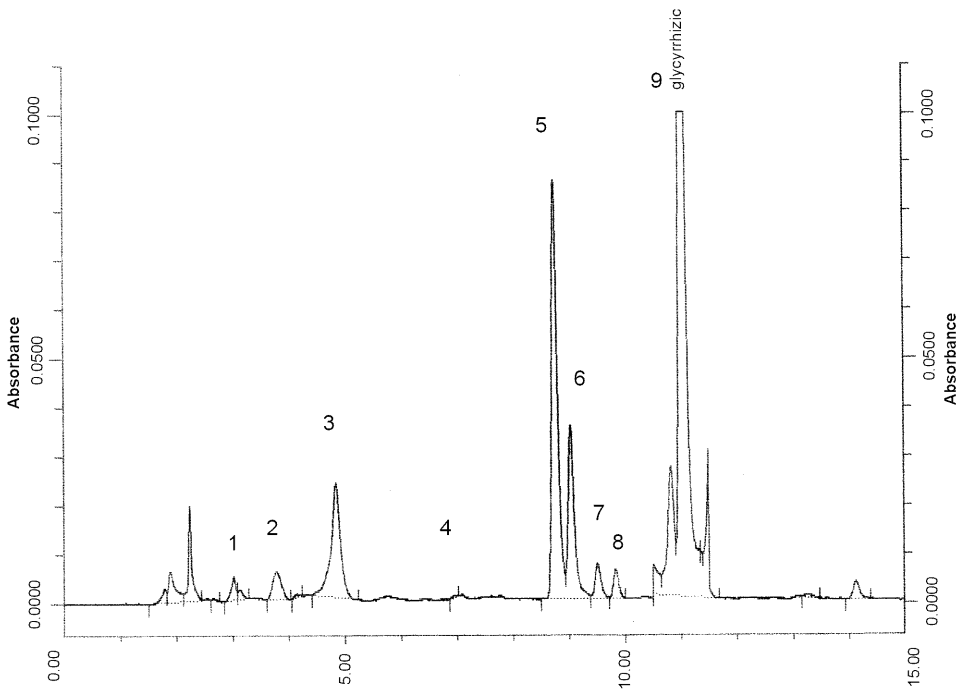
7.3.2 Injektoidaan 20 µl suodatettua näytettä (7.1) (aniksella maustetun alkoholin näyte). Suoritetaan analyysi edellä kuvattuja kromatografiaolosuhteita käyttäen (6.5).

7.3.3 Verrataan kromatogrammeja keskenään. Kromatogrammien on oltava hyvin samanlaisia sillä alueella, jolla kalkonit eluoituvat (se kromatogrammin alue, joka on ajettu 370 nm:n aallonpituudella edellä kuvatuissa analyysiolosuhteissa) (katso kuva 1).

8 **Tyypillinen pastiksen kromatogrammi**

Kuva 1

Edellä kuvatulla menetelmällä saatu kromatogrammi, josta näkyy kalkonien esiintyminen pastiksessa. Piikit 1—8 ovat kalkonien piikkejä ja piikki 9 on glysyrritsiinihappo.



9 **Menetelmän suorituskykyä kuvaavat ominaisuudet (tarkkuus)**

Laboratorioiden välisen testauksen tulokset:

Seuraavassa taulukossa esitetään menetelmän suorituskyky kalkonien esiintymisen tai puuttumisen osoittamiseksi pastiksessa ja aniksella maustetuissa alkoholijuomissa.

Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien mukaisesti.

Laboratorioiden välinen testaus tehty vuonna	1998
Laboratorioiden määrä	14
Näytteiden määrä	11
Analyytit	kalkonit

▼M1

Näytteet	A	B	C	D	E	F
Laboratorioiden määrä, kun poikkeavan tuloksen saaneet laboratoriot on poistettu	14	14	14	14	14	13
Poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	—	—	—	—	—	1 (*)
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	28	14	14	28	28	26
Kalkoneita esiintyy näytteessä, tulosten lukumäärä	28	14	14	0	28	0
Kalkoneita ei esiinny näytteessä, tulosten lukumäärä	0	0	0	28	0	26
Oikeiden tulosten osuus (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Epäjohdonmukaiset tulokset kahden rinnakkaisnäytteen välillä. Johtuu oletettavasti näytteiden sekaantumisesta.

Näytteet	G	H	I	J	K
Laboratorioiden määrä poikkeavien tulosten eliminoinnin jälkeen	14	14	14	14	14
Poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	—	—	—	—	—
Hyväksyttyjen tulosten lukumäärä	28	14	14	28	28
Kalkoneita esiintyy näytteessä, tulosten lukumäärä	0	0	0	0	0
Kalkoneita ei esiinny näytteessä, tulosten lukumäärä	28	14	14	28	28
Oikeiden tulosten osuus (%)	100	100	100	100	100

Näytetyypit:

A pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

B pastis, yksittäinen näyte

C pastis, yksittäinen näyte

D ”pastis” (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet

E ”pastis” (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet

F aniksella maustettu likööri (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet

G aniksella maustettu likööri (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet

H ouzo (ei sisällä kalkoneita), yksittäinen näyte

I ouzo (ei sisällä kalkoneita), yksittäinen näyte

J anis (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet

K ”pastis” (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet

▼M1

IX MUNANKELTUAINEN. MUNANKELTUAISPITOISUUDEN FOTOMETRINEN MÄÄRITTÄMINEN TISLATUISTA ALKOHOLIJUOMISTA

1 **Soveltamisala**

Menetelmä soveltuu munankeltuaispitoisuuden määrittämiseen munalikööristä ja munaa sisältävästä likööristä, kun pitoisuus on välillä 40—250 g/l.

2 **Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin**

ISO 3696: 1897 Analyyttiseen laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi — Määritelmä ja testimenetelmät

3 **Periaate**

Munankeltuaisen etanoliin liukenevat fosforiyhdisteet uutetaan ja ne määritetään fotometrisesti fosforimolybdaattikompleksina.

4 **Reagenssit ja materiaalit**

4.1 Kahteen kertaan tislattu vesi

4.2 Piimaa

4.3 96 % vol etanoli (CAS 64-17-5)

4.4 15 % magnesiumasetaattiliuos (CAS 16674-78-5)

4.5 10 % rikkihappo (CAS 7664-93-9)

4.6 1 N rikkihappo

4.7 0,16 g/l kaliumdivetyfosfaattiliuos (CAS 778-77-0), KH_2PO_4

4.8 Reagenssi fosfaatin määrittämiseksi:

Liuotetaan 20 g ammoniummolybdaattia (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 400 ml:aan vettä, jonka lämpötila on 50 ºC.

Liuotetaan toisessa astiassa 1 g ammoniumvanadaattia (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3 300 ml:aan kuumaa vettä, annetaan liuoksen jäähtyä ja lisätään sitten 140 ml väkevää typpihappoa (CAS 7697-37-2). Jäähtyneet liuokset kaadetaan 1 000 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin.

5 **Laitteet ja välineet**

5.1 100 ml:n erlenmeyerkolvi

5.2 Ultraäänihaude (tai magneettisekoitin)

5.3 100 ml:n mittapullo

5.4 20 ºC :n vesihaude

5.5 Suodatin (Whatman No. 4 tai vastaava)

5.6 Posliiniupokas (tai platinaupokas)

5.7 Kiehuva vesihaude

5.8 Keittolevy

5.9 Muhveliuuni

5.10 50 ml:n mittapullo

5.11 20 ml:n mittapullo

5.12 Spektrofotometri, jolla voidaan mitata aallonpituudella 420 nm

5.13 1 cm:n kyvetti.

6 **Näytteet**

Näytteet varastoidaan huoneenlämpötilassa ennen analyysiä.

7 **Mittauksen suoritus**

7.1 Näytteenvalmistus

7.1.1 Punnitaan 10 g näytettä 100 ml:n erlenmeyerkolviin (5.1).

▼M1

7.1.2 Lisätään vaiheittain 70 ml etanolia (4.3) pieninä määrinä ja sekoitetaan näytettä aina lisäyksen jälkeen. Kolvi laitetaan ultraäänihauteeseen (5.2) 15 minuutin ajaksi (tai sekoitetaan magneettisekoittimella (5.2) 10 minuutin ajan huoneenlämpötilassa).

7.1.3 Siirretään kolvin sisältö 100 ml:n mittapulloon (5.3) ja huuhdotaan erlenmeyerkolvi etanolilla (4.3). Täytetään merkkiin etanolilla (4.3) ja laitetaan pullo 20 ºC:n vesihauteeseen (5.4). Täytetään merkkiin 20 ºC:n lämpötilassa.

7.1.4 Lisätään hieman piimaata (4.2) ja suodatetaan (5.5), heitetään pois suodoksen ensimmäiset 20 ml.

7.1.5 Siirretään 25 ml suodoksesta posliiniupokkaaseen (tai platinaupokkaaseen) (5.6). Tämän jälkeen suodos väkevöidään kiehuvalla vesihauteella (5.7) varovasti haihduttaen ja siihen lisätään 5 ml 15 % magnesiumasetaattiliuosta (4.4).

7.1.6 Upokas asetetaan keittolevylle (5.8) ja kuumennetaan kuivaksi.

7.1.7 Jäämä tuhkataan kuumentamalla valkohehkuiseksi 600 ºC lämpötilassa muhveliuunissa (5.9), kunnes tuhka on valkoista — vähintään 1,5 tunnin ajan, mutta voidaan jättää uuniin yön ajaksi.

7.1.8 Huuhdotaan tuhka 10 ml:lla 10 % rikkihappoa (4.5) ja siirretään tislatulla vedellä (4.1) huuhtoen 50 ml:n mittapulloon (5.10). Täytetään merkkiin tislatulla vedellä (4.1) huoneenlämpötilassa. Tästä tuhkaliuoksesta otetaan 5 ml fosfaatin fotometriseen määritykseen käytettävän näyteliuoksen valmistamiseen.

7.2 Fosfaatin fotometrinen määritys

7.2.1 Vertailuliuos

7.2.1.1 Mitataan 10 ml 10 % rikkihappoa (4.5) 50 ml:n mittapulloon (5.10) ja täytetään merkkiin tislatulla vedellä (4.1).

7.2.1.2 5 ml:aan tätä liuosta (7.2.1.1), joka on 20 ml:n mittapullossa (5.11), lisätään 1 ml 1 N rikkihappoa (4.6) ja 2 ml fosfaattireagenssia (4.8). Täytetään merkkiin tislatulla vedellä (4.1).

7.2.1.3 Suljetaan löysästi tulpalla, ravistetaan ja kuumennetaan kiehuvassa vesihauteessa (5.7) 10 minuutin ajan. Jäähdytetään 20 ºC:n vesihauteessa (5.4) 20 minuuttia.

7.2.1.4 Täytetään 1 cm:n kyvetti (5.13) tällä vertailuliuoksella.

7.2.2 Näyteliuos

7.2.2.1 5 ml:aan tuhkaliuosta (7.1.8), joka on 20 ml:n mittapullossa (5.11), lisätään 1 ml 1 N rikkihappoa (4.6) ja 2 ml fosfaattireagenssia (4.8). Täytetään merkkiin tislatulla vedellä (4.1).

7.2.2.2 Suljetaan löysästi tulpalla, ravistetaan ja kuumennetaan kiehuvassa vesihauteessa (5.7) 10 minuutin ajan. Jäähdytetään 20 ºC:n vesihauteessa (5.4) 20 minuuttia.

7.2.2.3 Saatu keltainen liuos mitataan välittömästi spektrofotometrillä (5.12) 1 cm:n kyvetissä (5.13) 420 nm:n aallonpituudella vertailuliuosta (7.2.1.4) vastaan.

7.2.3 Kalibrointikäyrä

7.2.3.1 Kalibrointikäyrän määrittämiseksi lisätään 20 ml:n mittapulloihin (5.11), joissa on 1 ml 1 N rikkihappoa (4.6) ja 0, 2, 4, 6, 8 ja 10 ml kaliumdivetyfosfaattiliuosta (4.7), 2 ml fosfaattireagenssia (4.8). Täytetään merkkiin tislatulla vedellä (4.1).

7.2.3.2 Suljetaan löysästi tulpalla, ravistetaan ja kuumennetaan kiehuvassa vesihauteessa (5.7) 10 minuutin ajan. Jäähdytetään 20 ºC:n vesihauteessa (5.4) 20 minuuttia. Liuos mitataan välittömästi spektrofotometrillä (5.12) 1 cm:n kyvetissä (5.13) 420 nm:n aallonpituudella vertailuliuosta (7.2.1.4) vastaan.

7.2.3.3 Kalibrointikäyrän määrittäminen:

divelyfosfaattiliuos (ml)	0	2	4	6	8	10
P_2O_5 (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

▼M1

8 **Tulosten laskeminen**

Munankeltuaispitoisuus (g/l) lasketaan seuraavasta kaavasta:

$$\text{g/l munankeltuainen} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{tiheys}}{E/40}$$

missä:

110	muuntokerroin 100 g:ssa munankeltuaista olevan P_2O_5:n kokonaismäärän (g) laskemiseksi,
mg P_2O_5	kalibrointikäyrästä saatu arvo,
tiheys	munapohjaisen likööirin massa tilavuusyksikköä kohti (g/ml) 20 ºC:n lämpötilassa,
E	punnittu munapohjaisen likööirin määrä (g),
40	tuhkaliuoksen 5 ml:n osuudesta tuleva laimennuskerroin.

9 **Menetelmän suorituskykyä kuvaavat ominaisuudet (tarkkuus)**

Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset:

Seuraavassa taulukossa on esitetty munankeltuaista koskevat arvot.

Seuraavat tulokset saatiin kansainvälisestä menetelmän suorituskykyä arvioivasta tutkimuksesta, joka toteutettiin kansainvälisesti hyväksyttyjen menetelmien mukaisesti.

Laboratorioiden välisen testauksen vuosi:	1998
Laboratorioiden määrä:	24
Näytteiden määrä:	5
Analyytti:	munankeltuainen

Näytteet	A	B	C	D	E
Laboratorioiden määrä poikkeavien tulosten eliminoinnin jälkeen	19	20	22	20	22
Poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	3	4	2	4	2
Hyväksyttyjen tulosten määrä	38	40	44	40	44
Keskiarvo	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Toistettavuuden standardipoikkeama (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Toistettavuusraja (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Uusittavuuden standardipoikkeama (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Uusittavuusraja (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Näytetyypit:

A munalikööri, rinnakkaiset sokkonäytteet

B munalikööri, rinnakkaiset sokkonäytteet

C munalikööri, rinnakkaiset sokkonäytteet

D munalikööri, rinnakkaisnäytteet, joista toiseen on lisätty analyyttiä (*)

E munalikööri, rinnakkaiset sokkonäytteet