Detta dokument är endast avsett som dokumentationshjälpmedel och institutionerna ansvarar inte för innehållet

►**B**

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 2870/2000
av den 19 december 2000
om fastställande av gemenskapens referensmetoder för analys av spritdrycker

(EGT L 333, 29.12.2000, s. 20)

Ändrad genom:

		Officiella tidningen		
		nr	sida	datum
►**M1**	Kommissionens förordning (EG) nr 2091/2002 av den 26 november 2002	L 322	11	27.11.2002

▼B

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 2870/2000

av den 19 december 2000

om fastställande av gemenskapens referensmetoder för analys av spritdrycker

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning (EEG) nr 1576/89 av den 29 maj 1989 om allmänna bestämmelser för definition, beskrivning och presentation av spritdrycker ([1]), senast ändrad genom Anslutningsakten för Österrike, Finland och Sverige, särskilt artikel 4.8 i denna, och

av följande skäl:

(1) I artikel 4.8 i förordning (EEG) nr 1576/89 föreskrivs att metoder skall antas för analys av spritdrycker. Vid alla officiella kontroller och vid eventuella tvister bör referensmetoder användas för att säkerställa efterlevnaden av förordning (EEG) nr 1576/89 och kommissionens förordning (EEG) nr 1014/90 av den 24 april 1990 om närmare tillämpningsföreskrifter för definition, beskrivning och presentation av spritdrycker ([2]), senast ändrad genom förordning (EG) nr 2140/98 ([3]).

(2) Så långt det är möjligt bör de analytiska referensmetoder som antas för gemenskapen vara allmänt vedertagna.

(3) För att ta hänsyn till vetenskapliga framsteg och till det faktum att officiella laboratorier kan ha olika utrustning bör det vara tillåtet att, på laboratoriechefens ansvar, använda metoder som grundar sig på andra principer för mätning än de referensmetoder som beskrivs i bilagan till denna förordning, förutsatt att dessa metoder ger godtagbara resultat och uppfyller de krav som anges i bilagan till rådets direktiv 85/591/EEG av den 20 december 1985 om införande av provtagnings- och analysmetoder vid kontroll av livsmedel inom gemenskapen ([4]) samt på villkor att det kan visas att variationerna i de erhållna resultatens noggrannhet, repeterbarhet och reproducerbarhet faller inom intervallet för resultaten från de referensmetoder som beskrivs i den här förordningen. Om detta villkor är uppfyllt bör det vara tillåtet att använda andra analysmetoder. Det bör dock klart framgå att det i fall av tvister inte skall vara tillåtet att använda andra metoder än referensmetoderna.

(4) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från Kommittén för genomförande av regler om spritdrycker.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Gemenskapens referensmetoder för analys av spritdrycker skall

— vid officiella kontroller, eller

— då tvister uppstår,

enligt bestämmelserna i förordning (EEG) nr 1576/89 och förordning (EEG) nr 1014/90 vara de som anges i bilagan till den här förordningen.

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

▼B

Artikel 2

Genom undantag från artikel 1, första strecksatsen skall andra analysmetoder tillåtas, på laboratoriechefens ansvar och på villkor att metodernas tillförlitlighet och noggrannhet (repeterbarhet och reproducerbarhet) är åtminstone likvärdiga med dessa egenskaper hos de referensanalysmetoder av samma slag som anges i bilagan.

Artikel 3

Om inga referensanalysmetoder för gemenskapen har fastställts för påvisande och kvantifiering av ämnen i en viss spritdryck, skall följande metoder användas:

a) Analysmetoder som har godkänts enligt internationellt erkända förfaranden och som uppfyller kraven i bilagan till direktiv 85/591/EEG.

b) Analysmetoder som följer de standarder som rekommenderas av Internationella standardiseringsorganisationen (ISO).

c) Analysmetoder som godkänts och offentliggjorts av Internationella vinkontorets (OIV:s) generalförsamling.

d) I avsaknad av de metoder som anges i a, b och c skall någon av följande metoder användas, förutsatt att metoden i fråga uppfyller kraven på tillförlitlighet, repeterbarhet och reproducerbarhet.

   — En analysmetod som godkänts av den berörda medlemsstaten.

   — Om nödvändigt, en annan lämplig metod.

Artikel 4

I denna förordning avses med

a) *repeterbarhetsgräns*: kravet på repeterbarhet är uppfyllt då den absoluta skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförts med kort mellanrum av en och samma person på samma laboratorium och med samma utrustning inte överstiger repeterbarhetsgränsen i mer än 5 % av fallen {ISO 3534-1}.

b) *reproducerbarhetsgräns*: kravet på reproducerbarhet är uppfyllt då den absoluta skillnaden mellan resultaten från två bestämningar som utförts av olika personer på olika laboratorier och med olika utrustning inte överstiger reproducerbarhetsgränsen i mer än 5 % av fallen {ISO 3534-1}.

c) *tillförlitlighet*: ett mått på hur mycket ett testresultat avviker från det gällande referensvärdet {ISO 3534-1}.

Artikel 5

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

Den skall tillämpas från och med den 1 januari 2001.

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

▼B

BILAGA

BESKRIVNING AV ANALYTISKA REFERENSMETODER FÖR:

I. Bestämning av alkoholhalten (volymprocent)

Bilaga I: Beredning av destillat

Bilaga II: Mätning av destillatets densitet

— Metod A = pyknometri

— Metod B = elektronisk densitetsmätning

— Metod C = densitetsmätning med hydrostatisk våg

II. Bestämning av total torrsubstanshalt genom gravimetri

III. Bestämning av flyktiga ämnen och metanol

III.1 Allmänt

III.2 Flyktiga kongener: aldehyder, högre alkoholer, etylacetat och metanol (gaskromatografi)

III.3 Flyktig syra p.m.

IV. Vätecyanid p.m.

V. Anetol ►M1 ——— ◄

VI. Glycyrrhizinsyra ►M1 ——— ◄

VII. Chalkon ►M1 ——— ◄

VIII. Total sockerhalt p.m.

IX. Äggula ►M1 ——— ◄

▼B

I. BESTÄMNING AV ALKOHOLHALTEN (VOLYMPROCENT) I SPRITDRYCKER

Inledning

Referensmetoden beskrivs i följande två bilagor:

Bilaga I: Beredning av destillat

Bilaga II: Mätning av destillatets densitet

1. Tillämpningsområde

Metoden avser bestämning av verklig alkoholhalt (volymprocent) i spritdrycker.

2. Referenser

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

3. Termer och definitioner

3.1 *Referenstemperatur:*

Referenstemperaturen vid bestämning av alkoholhalt (volymprocent), densitet samt specifik vikt för spritdrycker är 20 ºC.

Anmärkning 1: Begreppet ”vid t ºC” används vid alla bestämningar (av densitet eller alkoholhalt i volymprocent) och alla temperaturer utom referenstemperaturen 20 ºC.

3.2 *Densitet:*

En spritdrycks *densitet* definieras som massan per volymenhet i vakuum vid 20 ºC. Den uttrycks i kg/m^3 och betecknas $\rho_{20\,°C}$ eller ρ_{20}.

3.3 *Specifik vikt:*

Med *specifik vikt* avses förhållandet, uttryckt som ett decimalbråk, mellan densiteten hos en spritdryck vid 20 ºC och densiteten av vatten vid samma temperatur. Som beteckning används någon av symbolerna $d_{20\,°C/20\,°C}$, $d_{20/20}$, eller – om det inte finns någon risk för förväxling – bara d. Angivelsen på analysintyget av vilka parametrar som mätts skall endast göras med de symboler som definieras ovan.

Anmärkning 2: Det är möjligt att beräkna den specifika vikten från densiteten ρ_{20} vid 20 ºC:

$\rho_{20} = 998{,}203 \times d_{20/20}$ eller $d_{20/20} = \rho_{20}/998{,}203$ där 998,203 är vattnets densitet vid 20 ºC.

3.4 *Verklig alkoholhalt i volymprocent*

En spritdrycks verkliga alkoholhalt i volymprocent motsvarar antalet liter etylalkohol i 100 l av en vatten/alkohol-blandning med samma densitet som alkoholen eller spriten efter destillering. Referensvärdena för alkoholhalt i volymprocent (vol- %) vid 20 ºC i förhållande till densiteten vid 20 ºC för de olika vatten/alkohol-blandningar som skall användas framgår av den internationellt använda tabell som fastställts i Rekommendation nr 22 från Internationella organisationen för legal metrologi.

Det allmänna sambandet mellan alkoholhalt i volymprocent och densitet hos en vatten/alkohol-blandning vid en given temperatur anges på sidan 40 i kapitel 3 ”Alkoholhalt i volymprocent” i bilagan till förordning (EEG) nr 2676/90 (EGT L 272, 3.10.1990, s. 1) eller i OIV:s handbok med analysmetoder (1994) (s. 17).

Anmärkning 3: Det är mycket svårt att göra en korrekt bestämning av volymen för vissa likörer och ”crèmes”. I dessa fall skall provet vägas och alkoholhalten först beräknas utifrån massan.

▼B

Omvandlingsformel:

$$\text{alkoholhalt (vol-\%)} = \frac{\text{ASM (mass-\%)} \times \rho_{20}\text{ (prov)}}{\rho_{20}\text{ (alkohol)}}$$

där ASM = alkoholhalten i massprocent,

ρ_{20} (alkohol) = 789,24 kg/m^3

4. **Princip**

Destillatets alkoholhalt i volymprocent bestäms genom pyknometri, elektronisk densitetsmätning eller densitetsmätning med hydrostatisk våg.

▼B

BILAGA I: BEREDNING AV DESTILLAT

1. **Omfattning**

Metoden omfattar beredning av destillat som skall användas för att bestämma den verkliga alkoholhalten (volymprocent) i spritdrycker.

2. **Princip**

Spriten destilleras för att separera etylalkohol och andra flyktiga ämnen från icke-flyktiga beståndsdelar.

3. **Reagens och material**

3.1 Kokstenar.

3.2 Antiskumningsmedel i koncentrerad form (för likörer av typen ”crèmes”).

4. **Utrustning**

Vanlig laboratorieutrustning, och särskilt följande:

4.1 Vattenbad med termostat för temperaturintervallet 10–15 ºC.

Vattenbad med termostat för temperaturen 20 ºC (± 0,2 ºC).

4.2 Mätkolvar av klass A, 100 och 200 ml, kalibrerade till en noggrannhet av ± 0,1 % respektive 0,15 %.

4.3 Destillationsapparat:

4.3.1 Allmänna krav.

Den destillationsapparat som skall användas skall uppfylla följande krav:

— Antalet skarvar skall inte överstiga det minsta antal som krävs för att systemet skall vara tätt.

— Användning av en anordning för att förhindra skumbildning (genom att ångan för med sig kokande vätska) och för att jämna ut destillationshastigheten hos spritdrycker med hög alkoholhalt.

— Snabb och fullständig kondensering av alkoholångan.

— De första destillationsfraktionerna skall samlas upp i en vattenlösning.

Värmekällan skall vara försedd med en ändamålsenlig värmefördelare för att förhindra pyrogena reaktioner i de icke-flyktiga kemiska ämnena.

4.3.2 Ett exempel på en användbar destillationsapparat visas i figur 1. Den omfattar följande delar:

— Rundkolv, 1 liter, med slipad hals av standardtyp.

— Rektifieringskolonn med en höjd på minst 20 cm (t.ex. en Vigreuxkolonn).

— Knärör försett med en cirka 10 cm West-kylare med rak kant. Röret skall anslutas vertikalt.

— Kylslinga, 40 cm.

— Utdraget rör genom vilket destillatet förs ned i ett graderat uppsamlingskärl som innehåller en mindre mängd vatten.

Anmärkning: Den apparat som beskrivs ovan skall användas för provmängder på minst 200 ml. Apparaten kan dock anpassas för mindre provvolymer genom att en mindre destillationskolv används. Detta förutsätter att apparaten är utrustad med ett stänkskydd eller annan anordning för att förhindra att ångan för med sig kokande vätska.

5. **Lagring av testprovet**

Proven skall förvaras i rumstemperatur före analys.

6. **Utförande**

Anmärkning:

Destillation kan också ske enligt den metod som publicerats av IUPAC (1968).

6.1 Destillationsapparaten

▼B

Apparaten skall uppfylla följande krav:

Destilleringen av 200 ml vatten/alkohol-lösning av känd koncentration (ungefär 50 volymprocent) får inte leda till alkoholförluster på mer än 0,1 volymprocent.

6.2 Spritdrycker med en alkoholhalt under 50 volymprocent.

Mät upp 200 ml spritdryck i en mätkolv.

Notera vätskans temperatur eller håll vätskan vid standardtemperaturen (20 ºC).

För över provet till destillationsapparatens rundkolv och skölj mätkolven med 20 ml destillerat vatten. Upprepa sköljningen två gånger. För över allt sköljvatten till destillationskolven.

Anmärkning: För spritdrycker som innehåller mindre än 250 g torrsubstans per liter räcker det med 60 ml sköljvatten. För att förhindra pyrolys skall i övriga fall åtminstone 70 ml sköljvatten användas om torrsubstanshalten är 300 g/l, 85 ml vid 400 g/l och 100 ml vid 500 g/l (vissa fruktlikörer och ”crèmes”). Volymen skall vara proportionell mot provvolymen.

Lägg i några kokstenar (3.1) (och antiskumningsmedel för ”crèmes”).

För över 20 ml destillerat vatten till den ursprungliga 200 ml mätkolven (som senare också skall användas för att samla upp destillatet). Placera kolven i ett kallt vattenbad (4.1) (10–15 ºC för spritdrycker som är smaksatta med anis).

Vid destilleringen bör man undvika bubbelbildning och förkolning. Skaka kolven med jämna mellanrum. Avbryt destilleringen då destillatets yta befinner sig några millimeter under mätkolvens märke.

Vänta tills destillatet har svalnat till vätskans utgångstemperatur ± 0,5 ºC. Späd till märket med destillerat vatten och blanda omsorgsfullt.

Destillatet används för bestämning av alkoholhalten (volymprocent) (bilaga II).

6.3 Spritdrycker med en alkoholhalt på mer än 50 volymprocent.

Mät upp 100 ml spritdryck, för över den till en 100 ml mätkolv och sedan till destillationsapparatens rundkolv.

Skölj mätkolven upprepade gånger med destillerat vatten och för över sköljvattnet till rundkolven i destillationsapparaten. Använd så mycket vatten att kolven totalt kommer att innehålla 230 ml vätska.

För över 20 ml destillerat vatten till en 200 ml mätkolv (som senare också skall användas för att samla upp destillatet). Placera kolven i ett kallt vattenbad (4.1) (10–15 ºC för spritdrycker som är smaksatta med anis).

Skaka mätkolven med jämna mellanrum under destilleringen. Avbryt destilleringen då destillatets yta befinner sig några millimeter under mätkolvens märke (200 ml).

Vänta tills destillatet har svalnat till vätskans utgångstemperatur ± 0,5 ºC. Späd till märket med destillerat vatten och blanda omsorgsfullt.

Destillatet används för bestämning av alkoholhalten i volymprocent (bilaga II).

Anmärkning: Spritdryckens alkoholhalt (volymprocent) är dubbelt så hög som destillatets.

▼B

BILAGA II: MÄTNING AV DESTILLATETS DENSITET

METOD A: BESTÄMNING AV VERKLIG ALKOHOLHALT (VOLYMPROCENT) I SPRITDRYCKER – PYKNOMETRISK MÄTNING

A.1 **Princip**

Alkoholhalten (volymprocent) kan beräknas utifrån det värde på destillatets densitet som erhållits med pyknometri.

A.2 **Reagens och material**

Vid analysen skall bara användas – om inget annat särskilt anges – reagens som är särskilt avsedda för analysändamål och vatten som håller minst klass 3 enligt definitionen i ISO 3696:1987.

A.2.1 Natriumkloridlösning, 2 vikt- %.

För att bereda 1 liter, väg upp 20 g natriumklorid och lös i vatten till en slutvolym av 1 liter.

A.3 **Utrustning**

Vanlig laboratorieutrustning, och särskilt följande:

A.3.1 Analysvåg med en känslighet på 0,1 mg.

A.3.2 Termometer med slipad anslutningsfog och med en skala i tiondels grader från 10 till 30 ºC. Termometern skall vara godkänd eller kalibrerad mot en godkänd termometer.

A.3.3 Pyknometer i pyrexglas med en volym på ungefär 100 ml. Den skall vara utrustad med en löstagbar termometer med slipad anslutningsfog (A.3.2). Pyknometern skall också ha ett 25 mm långt sidorör med en inre diameter på (högst) 1 mm som slutar i en slipad konisk anslutningsfog. Andra pyknometrar än de som beskrivs i ISO 3507, till exempel sådana med en volym på 50 ml, får också användas om de är lämpliga för ändamålet.

A.3.4 Tareringsflaska med samma yttre volym (± 1 ml) som pyknometern och med samma massa som pyknometern då denna är fylld med en vätska med densiteten 1,01 (natriumkloridlösning A.2.1).

A.3.5 Värmeisolerad mantel som är exakt avpassad efter pyknometerns form.

Anmärkning 1: För bestämningen av spritdryckers densitet under vakuum behövs en våg med två vågskålar, en pyknometer och en tareringsflaska med samma yttre volym för att neutralisera effekten av luftens varierande lyftkraft. Denna enkla teknik kan också användas i kombination med en våg med en vågskål, förutsatt att tareringsflaskan kontinuerligt vägs om så att förändringar av luftens lyftkraft kan registreras.

A.4 **Utförande**

Anmärkningar:

För bestämning av alkoholhalten används en 100 ml pyknometer, eftersom detta ger högst tillförlitlighet. Det går också bra att använda en mindre pyknometer, till exempel på 50 ml.

A.4.1 Kalibrering av pyknometern

Pyknometern kalibreras genom att följande parametrar bestäms:

— Den tomma pyknometerns egenvikt.

— Pyknometerns volym vid 20 ºC.

— Den vattenfyllda pyknometerns vikt vid 20 ºC.

A.4.1.1 Kalibrering med hjälp av en våg med en enda vågskål:

Bestäm följande värden:

— Den rena, torra pyknometerns vikt (P).

— Den vattenfyllda pyknometerns vikt vid t ºC (P1).

— Tareringsflaskans vikt (T0).

A.4.1.1.1 Väg den rena, torra pyknometern (P).

▼B

A.4.1.1.2 Fyll pyknometern försiktigt med destillerat vatten av rumstemperatur och sätt i termometern.

Torka försiktigt av pyknometern så att den blir torr och placera den i den värmeisolerade manteln. Blanda innehållet genom att vända upp och ned på kärlet till dess att termometerns utslag stabiliserats.

Placera pyknometern i jämnhöjd med sidorörets övre kant. Läs av temperaturen t ºC noggrant och korrigera om så krävs för eventuella felaktigheter i temperaturskalan.

Väg den vattenfyllda pyknometern. Den erhållna vikten betecknas P1.

A.4.1.1.3 Väg tareringsflaskan. Vikten betecknas T0.

A.4.1.1.4 Beräkning av resultat

— Den tomma pyknometerns egenvikt = P – m

där m är massan av luften i pyknometern:

m = 0,0012 × (P1 – P)

Anmärkning 2: 0,0012 är densiteten hos torr luft vid 20 ºC och trycket 760 mm Hg.

— Pyknometerns volym vid 20 ºC:

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

där F_t är temperaturfaktorn t ºC som erhållits från tabell I i kapitel 1 ”Densitet och specifik vikt” i bilagan till förordning (EEG) nr 2676/90 (s. 10).

Värdet på $V_{20\,°C}$ skall anges med en noggrannhet av 0,001 ml.

— Massan av vattnet i pyknometern vid 20 ºC:

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ där 0,998203 är vattnets densitet vid 20 ºC.

Anmärkning 3: Om det är nödvändigt kan värdet 0,99715 användas för densiteten i luft, och alkoholhalten beräknas utifrån ett värde för motsvarande densitet i luft som hämtas från tabellerna från HM Customs and Excise tables. I sådana fall skall ingen korrigering göras för massan av den luft som trängts undan i pyknometern.

A.4.1.2 Kalibrering med hjälp av en våg med två vågskålar:

A.4.1.2.1 Placera tareringsflaskan på vänster vågskål och den rengjorda, torra pyknometern med dess uppsamlingspropp på höger vågskål. De båda vågskålarna balanseras genom att vikter placeras på pyknometersidan. Vikten i gram betecknas p.

A.4.1.2.2 Fyll pyknometern försiktigt med destillerat vatten av rumstemperatur och sätt i termometern. Torka försiktigt av pyknometern så att den blir helt torr och placera den i den värmeisolerade manteln. Blanda innehållet genom att vända upp och ned på kärlet till dess att termometerns utslag stabiliserats.

Placera pyknometern i jämnhöjd med sidorörets övre kant. Rengör sidoröret och stoppa i uppsamlingsproppen. Läs av temperaturen t ºC noggrant och korrigera om så krävs för eventuella felaktigheter i temperaturskalan.

Väg den vattenfyllda pyknometern och låt massan p' gram motsvara jämviktsläget.

A.4.1.2.3 Beräkning av resultat

— Den tomma pyknometerns egenvikt = p + m

där m är massan av luften i pyknometern.

m = 0,0012 × (p – p')

— Pyknometerns volym vid 20 ºC:

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

där F_t är temperaturfaktorn t ºC från tabell I i kapitel 1, ”Densitet och specifik vikt”, i bilagan till förordning (EEG) nr 2676/90 (s. 10).

Värdet på $V_{20\,°C}$ skall vara känt med en noggrannhet av 0,001 ml.

▼B

— Massan av vattnet i pyknometern vid 20 ºC:

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

där 0,998203 är vattnets densitet vid 20 ºC.

A.4.2 Bestämning av testprovets alkoholhalt

A.4.2.1 Använd en våg med en enda vågskål.

A.4.2.1.1 Väg tareringsflaskan. Vikten betecknas T1.

A.4.2.1.2 Väg pyknometern med det beredda destillatet (se bilaga I). Vikten vid t ºC betecknas P2.

A.4.2.1.3 Beräkning av resultat

— dT = T1 - T0

— Massan av den tomma pyknometern då mätningen görs

= P − m + dT

— Massan av vätskan i pyknometern vid t ºC

= P2 − (P − m + dT)

— Densiteten vid t ºC (g/ml)

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

— Värdet för densiteten vid t ºC omvandlas till kg/m³ genom att $\rho_{t\,°C}$ multipliceras med 1 000. Det erhållna värdet betecknas ρ_t.

— Räkna om ρ_t till ρ_{20} med hjälp av densitetstabellen ρT för vatten/alkohol-blandningar (tabell II i bilaga II till OIV:s handbok med analysmetoder (1994), s. 17–29).

Leta rätt på den horisontella rad i tabellen som motsvarar temperaturen T i hela grader och som befinner sig direkt under t ºC, dvs. den lägsta densitet som är högre än ρ_t. Använd det tabellvärde som anges under denna densitet för att beräkna spritdryckens densitet (ρ_t) vid temperaturen T (hela grader).

— Beräkna med hjälp av temperaturkurvan i dess helhet skillnaden mellan densiteten ρ', som i tabellen ligger direkt ovanför ρ_t, och den beräknade densiteten ρ'. Dividera denna skillnad med det tabellvärde som återfinns till höger om densiteten ρ'. Kvoten ger decimaldelen av alkoholhalten medan heltalet återfinns överst i kolumnen där ρ' står (Dt, alkoholhalten).

Anmärkning 4: Alternativt kan pyknometern stå i ett vattenbad med temperaturen 20 ± 0,2 ºC vid påfyllningen upp till märket.

A.4.2.1.4 Resultat

Då densiteten ρ_{20} är känd kan den verkliga alkoholhalten beräknas med hjälp av de tabeller som anges nedan:

I tabellen anges alkoholhalten i volymprocent (vol- %) vid 20 ºC i förhållande till densiteten hos olika vatten/alkohol-blandningar vid 20 ºC. Tabellen har fastställts i Rekommendation nr 22 från Internationella organisationen för legal metrologi och används internationellt.

A.4.2.2 Kalibrering med hjälp av en våg med två vågskålar.

A.4.2.2.1 Väg pyknometern tillsammans med det beredda destillatet (se del I). Massan vid t ºC betecknas p".

A.4.2.2.2 Beräkning av resultat

— Massan av vätskan i pyknometern vid t ºC.

= p + m − p"

— Densiteten vid t ºC (g/ml)

$\rho_{t\,°C} = (p + m - p")/V_{20\,°C}$

— Densiteten vid t ºC skall uttryckas i kg/m³. Korrigera för temperaturen och räkna sedan fram alkoholhalten vid 20 ºC på det sätt som anges ovan för användning av en våg med endast en vågskål.

A.5 **Metodutvärdering (noggrannhet)**

A.5.1 Statistiska resultat från provningsjämförelsen

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden [1] [2].

▼B

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	20
Antal prov	6

Prov	A	B	C	D	E	F
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	19	20	17	19	19	17
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	1	—	2	1	1	3
Antal godkända resultat	38	40	34	38	38	34
Medelvärde ($\bar{x}$) vol-%	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) vol-%	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Repeterbarhetsgräns (r) vol-%	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) vol-%	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Reproducerbarhetsgräns (R) vol-%	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Provtyper:
A Fruktlikör, ”split level” (*).
B Konjak, dubbel-blind-försök.
C Whisky, dubbel-blind-försök.
D Grappa, ”split level” (*).
E Akvavit, ”split level” (*).
F Rom, ”split level” (*).

METOD B: BESTÄMNING AV VERKLIG ALKOHOLHALT (VOLYMPROCENT) I SPRITDRYCKER – ELEKTRONISK DENSITETSMÄTNING BASERAD PÅ RESONANSFREKVENSOSCILLATION HOS ETT PROV I EN OSCILLERANDE MÄTCELL

B.1 Princip

Vätskans densitet bestäms genom elektronisk mätning av oscillationerna hos ett vibrerande U-format rör. Provet överförs till ett oscillerande system vars specifika frekvens därigenom förändras.

B.2 Reagens och material

Vid analysen skall bara användas – om inget annat särskilt anges – reagens som är särskilt avsedda för analysändamål och vatten som håller minst klass 3 enligt definitionen i ISO 3696:1987.

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

B.2.2 Torr luft.

B.3 Utrustning

Vanlig laboratorieutrustning, och särskilt följande:

B.3.1 Densitetsmätare med digital display.

Den elektroniska densitetsmätare som används skall kunna ange densiteten i g/ml med fem decimalers noggrannhet.

Anmärkning 1: Densitetsmätaren skall placeras i en stabil hållare som är helt vibrationsisolerad.

▼B

B.3.2 Termostat.

De värden som erhålls från densitetsmätarens är bara användbara om mätcellen är kopplad till en inbyggd termostat som håller en konstant temperatur ± 0,02 ºC.

Anmärkning 2: Det är mycket viktigt att temperaturen i mätcellen ställs in exakt och att den kan kontrolleras med stor noggrannhet, eftersom ett fel på 0,1 ºC kan leda till densitetsförändringar i storleksordningen 0,1 kg/m^3.

B.3.3 Autosampler eller sprutor för injicering av prov.

B.4 **Utförande**

B.4.1 Kalibrering av densitetsmätaren

Då instrumentet används för första gången skall det kalibreras i enlighet med tillverkarens instruktioner. Det skall omkalibreras med jämna mellanrum och kontrolleras mot en godkänd referensstandard eller en laboratorieintern referenslösning, baserad på en godkänd referensstandard.

B.4.2 Bestämning av provets densitet

B.4.2.1 Om så krävs skall cellen före mätningen rengöras med aceton eller absolut alkohol samt torkas med torr luft. Skölj cellen med provet.

B.4.2.2 Injicera provet i cellen (med hjälp av en spruta eller autosampler) till dess att den är helt fylld. Det är viktigt att inga luftbubblor följer med. Provet skall vara homogent och får inte innehålla några fasta partiklar. Innan provet analyseras skall därför eventuella suspenderade partiklar avlägsnas genom filtrering.

B.4.2.3 Vänta tills mätvärdet stabiliserats. Notera densiteten ρ_{20} eller den alkoholhalt som densitetsmätaren anger.

B.4.3 Resultat

Då densiteten ρ_{20} är känd kan den verkliga alkoholhalten beräknas med hjälp av de tabeller som anges nedan.

I tabellen anges alkoholhalten i volymprocent (vol- %) vid 20 ºC i förhållande till densiteten hos olika vatten/alkohol-blandningar vid 20 ºC. Tabellen har fastställts i Rekommendation nr 22 från Internationella organisationen för legal metrologi och används internationellt.

B.5 **Metodutvärdering (noggrannhet)**

B.5.1 Statistiska resultat från provningsjämförelsen

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden [1] [2].

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	16
Antal prov	6

Prov	A	B	C	D	E	F
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	11	13	15	16	14	13
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	2	3	1	—	1	2
Antal godkända resultat	22	26	30	32	28	26
Medelvärde ($\bar{x}$) vol-%	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) vol-%	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Repeterbarhetsgräns (r) vol-%	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) vol-%	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205

▼B

Prov	A	B	C	D	E	F
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Reproducerbarhetsgräns (R) vol-%	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Provtyper:
A Fruktlikör, ”split level” (*).
B Konjak, dubbel-blind-försök.
C Whisky, dubbel-blind-försök.
D Grappa, ”split level” (*).
E Akvavit, ”split level” (*).
F Rom, ”split level” (*).

METOD C: BESTÄMNING AV VERKLIG ALKOHOLHALT (VOLYMPROCENT) I SPRITDRYCKER – DENSIMETRISK MÄTNING MED HYDROSTATISK VÅG

C.1 Princip

Alkoholhalten i spritdrycker kan fastställas genom densitetsmätning med en hydrostatisk våg, som bygger på Arkimedes princip. Enligt denna princip påverkas en kropp som nedsänks i vätska av en uppåtriktad kraft som motsvarar massan av den undanträngda vätskan.

C.2 Reagens och material

Vid analysen skall bara användas – om inget annat särskilt anges – reagens som är särskilt avsedda för analysändamål och vatten som håller minst klass 3 enligt definitionen i ISO 3696:1987.

C.2.1 Rengöringslösning avsedd för flottören (natriumhydroxid, 30 vikt- %)

För att bereda 100 ml lösning, väg upp 30 g natriumhydroxid och späd till märket med 96 % etanol (volymprocent).

C.3 Utrustning

Vanlig laboratorieutrustning, och särskilt följande:

C.3.1 Hydrostatisk våg med en enda vågskål och med en känslighet på ± 1 mg.

C.3.2 Flottör som har en volym på minst 20 ml och som är särskilt anpassad till vågen. Den tråd som flottören är upphängd i får ha en diameter på högst 0,1 mm.

C.3.3 Mätcylinder med nivåmarkering. Flottören skall rymmas helt och hållet i den del av cylindern som befinner sig under märket. Vätskeytan får bara brytas av den tråd som flottören är upphängd i. Mätcylinderns innerdiameter skall vara åtminstone 6 mm större än flottörens diameter.

C.3.4 Termometer (eller sond för temperaturmätning) som är indelad i grader och tiondels grader från 10 till 40 ºC och kalibrerad till en noggrannhet av 0,05 ºC.

C.3.5 Vikter som kalibrerats av ett officiellt certifieringsorgan.

Anmärkning 1: Det går också att använda en våg med två vågskålar; principen för detta beskrivs i kapitel 1, ”Densitet och specifik vikt”, i bilagan till förordning (EEG) nr 2676/90 (s. 7).

C.4 Utförande

Flottören och mätcylindern skall mellan varje mätning rengöras med destillerat vatten, torkas av med luddfritt mjukt papper för laboratoriebruk och sedan sköljas med den lösning vars densitet skall bestämmas. För att minimera förlusterna av alkohol genom avdunstning skall mätningarna göras så snart apparaten visar stabila värden.

C.4.1 Kalibrering av vågen

Även om de flesta vågar har inbyggda kalibreringssystem skall den hydrostatiska vågen också kunna kalibreras med vikter som i sin tur kalibrerats av ett officiellt certifieringsorgan.

▼B

C.4.2 Kalibrering av flottören

C.4.2.1 Fyll mätcylindern till märket med dubbeldestillerat vatten (eller vatten av samma renhetsgrad, t.ex. mikrofiltrerat vatten med konduktiviteten 18,2 MΩ/cm) som håller en temperatur på mellan 15 och 25 ºC, dock helst 20 ºC.

C.4.2.2 Sänk ned flottören och termometern. Rör om. Läs av vätskans densitet och korrigera om nödvändigt det avlästa värdet så att det motsvarar värdet för vatten vid mättemperaturen i fråga.

C.4.3 Kontroll med en vatten/alkohol-lösning

C.4.3.1 Fyll mätcylindern till märket med en vatten/alkohol-blandning av känd alkoholhalt och med en temperatur på 15–25 ºC, dock helst 20 ºC.

C.4.3.2 Sänk ned flottören och termometern. Rör om. Läs av vätskans densitet (eller alkoholhalten om detta är möjligt) från instrumentet. Det erhållna värdet på alkoholhalten bör motsvara den alkoholhalt som tidigare fastställts.

Anmärkning 2: Denna lösning med känd alkoholhalt kan också användas i stället för dubbeldestillerat vatten då flottören kalibreras.

C.4.4 Mätning av destillatets densitet (eller av dess alkoholhalt, om sådan utrustning finns)

C.4.4.1 Fyll mätcylindern med testprovet upp till märket.

C.4.4.2 Sänk ned flottören och termometern. Rör om. Läs av vätskans densitet (eller alkoholhalten om detta är möjligt) från instrumentet. Notera temperaturen om densiteten mäts vid t ºC (ρ_t).

C.4.4.3 Räkna om ρ_t till ρ_{20} med hjälp av densitetstabellen ρT för vatten/alkohol-blandningar (tabell II i bilaga II till OIV:s handbok med analysmetoder (1994) s. 17–29).

C.4.5 Rengöring av flottören och mätcylindern

C.4.5.1 Fyll mätcylindern med den särskilda rengöringslösningen för flottörer. Sänk ned flottören i lösningen.

C.4.5.2 Låt flottören ligga i vätskan i 1 tim. Rotera den med jämna mellanrum.

C.4.5.3 Skölj av flottören. Använd rikligt med kranvatten och därefter destillerat vatten.

C.4.5.4 Torka med luddfritt mjukt papper för laboratoriebruk.

Rengöringen skall göras första gången som flottören används och därefter vid behov.

C.4.6 Resultat

Då densiteten ρ_{20} är känd kan den verkliga alkoholhalten beräknas med hjälp av de tabeller som anges nedan.

I tabellen anges alkoholhalten i volymprocent (vol- %) vid 20 ºC i förhållande till densiteten hos olika vatten/alkohol-blandningar vid 20 ºC. Tabellen har fastställts i Rekommendation nr 22 från Internationella organisationen för legal metrologi och används internationellt.

C.5 **Metodutvärdering (noggrannhet)**

C.5.1 Statistiska resultat från provningsjämförelsen

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden [1] [2].

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	12
Antal prov	6

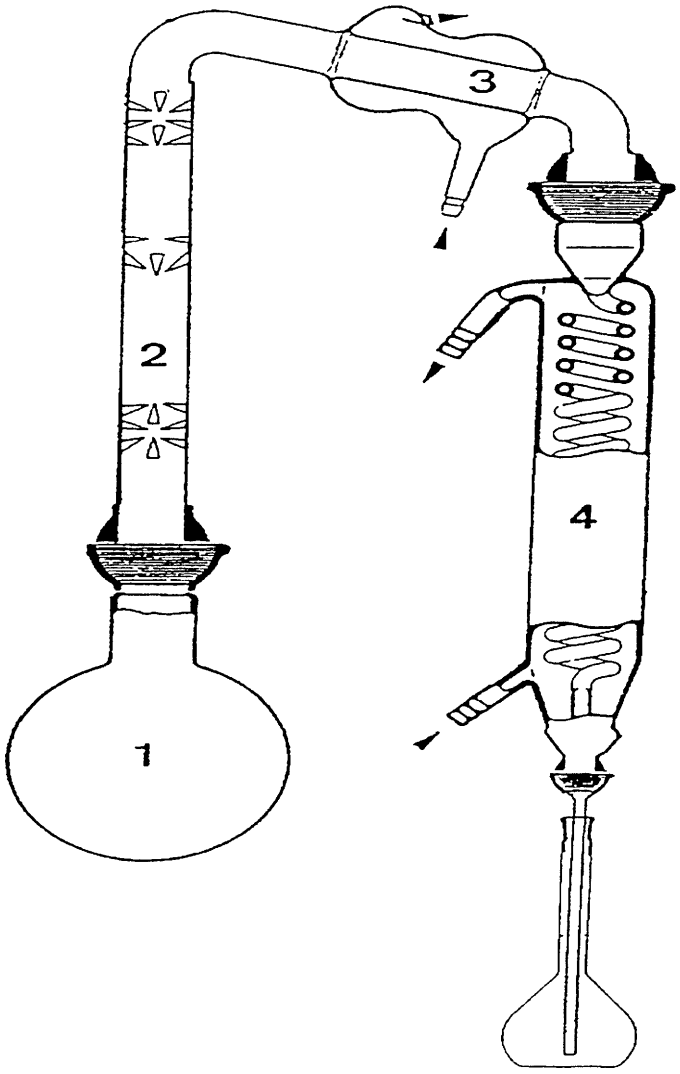
Prov	A	B	C	D	E	F
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	12	10	11	12	11	9
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	—	2	1	—	1	2

▼B

Prov	A	B	C	D	E	F
Antal godkända resultat	24	20	22	24	22	18
Medelvärde ($\bar{x}$) vol-%	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) vol-%	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Repeterbarhetsgräns (r) vol-%	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) vol-%	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Reproducerbarhetsgräns (R) vol-%	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Provtyper:
A Fruktlikör, ”split level” (*).
B Konjak, dubbel-blind-försök.
C Whisky, dubbel-blind-försök.
D Grappa, ”split level” (*).
E Akvavit, ”split level” (*).
F Rom, ”split level” (*).

▼B



Figur 1. Destillationsapparat för mätning av verklig alkoholhalt (volymprocent) i spritdrycker

1. Rundkolv, 1 liter, med slipad hals av standardtyp.
2. Rektifieringskolonn, 20 cm, av typen Vigreux.
3. West-kylare, 10 cm, med rak kant.
4. Kylslinga, 40 cm.

▼B

II. BESTÄMNING AV TOTAL TORRSUBSTANSHALT I SPRITDRYCKER GENOM GRAVIMETRI

1. Omfattning

I förordning (EEG) nr 1576/89 anges att metoden bara skall användas för akvavit vars torrsubstanshalt inte överstiger 15 g/l.

2. Referenser

ISO 3696:1987 Water for analytical use – Specifications and test methods

3. Definition

Begreppet *total mängd torrsubstans* inbegriper alla ämnen som inte är flyktiga under vissa angivna förhållanden.

4. Princip

Vägning av den rest som återstår efter det att alkoholen avdunstat på ett kokande vattenbad och provet torkats i ugn.

5. Utrustning

5.1 Flatbottnat runt indunstningskärl, 55 mm i diameter.

5.2 Kokande vattenbad.

5.3 Pipett, 25 ml, klass A.

5.4 Torkugn.

5.5 Exsickator.

5.6 Analysvåg med en känslighet på 0,1 mg.

6. Insamling och förvaring av prov

Proven förvaras vid rumstemperatur i väntan på analys.

7. Utförande

7.1 Pipettera över 25 ml sprit med en torrsubstanshalt på mindre än 15 g/l till ett flatbottnat, runt indunstningskärl med diametern 55 mm diameter och med känd vikt. Under avdunstningsprocessens första timme skall indunstningskärlet stå på locket till ett kokande vattenbad. Vätskan i kärlet får inte koka, eftersom detta kan leda till förluster genom stänk. Låt stå ytterligare 1 tim. i direktkontakt med ångan från det kokande vattenbadet.

7.2 Avsluta indunstningen genom att låta indunstningskärlet stå 2 tim. i torkugn vid 105 ºC ± 3 ºC. Låt indunstningskärlet svalna i en exsickator och väg sedan kärlet med innehåll.

8. Beräkning av resultat

Spritdryckens torrsubstanshalt motsvarar massan av den rest som återstår i indunstningskärlet multiplicerat med en faktor 40. Torrsubstanshalten uttrycks i g/l med en decimals noggrannhet.

9. Metodutvärdering (noggrannhet)

9.1. Statistiska resultat från provningsjämförelsen

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden [1] [2].

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	10
Antal prov	4

▼B

Prov	A	B	C	D
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	9	9	8	9
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	1	1	2	—
Antal godkända resultat	18	18	16	18
Medelvärde ($\bar{x}$) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Repeterbarhetsgräns (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Reproducerbarhetsgräns (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Rom, ”split level”.
C Grappa, ”split level”.
D Akvavit, ”split level”.

▼B

III. BESTÄMNING AV FLYKTIGA ÄMNEN OCH METANOL I SPRITDRYCKER

III.1 ALLMÄNNA KOMMENTARER

1. **Definitioner**

I förordning (EEG) nr 1576/89 fastställs miniminivåer för flyktiga ämnen utom etanol och metanol för ett antal spritdrycker (rom, sprit baserad på vindruvor, fruktbrännvin etc.). För dessa spritdrycker (men inte för andra typer) anses de nämnda miniminivåerna normalt sett motsvara summan av koncentrationerna av följande ämnen:

1. Flyktig syra, uttryckt som ättiksyra.
2. Aldehyder uttryckt som etanal, dvs. summan av etanal (acetaldehyd) och den etanalfraktion som ingår i 1,1-dietoxetan (acetal).
3. Följande högre alkoholer: propan-1-ol, butan-1-ol, butan-2-ol och 2-metylpropan-1-ol, bestämda var för sig, samt 2-metylbutan-1-ol och 3-metylbutan-1-ol, bestämda tillsammans eller var för sig.
4. Etylacetat.

Det finns två konventionella metoder för kvantitativ analys av flyktiga ämnen:

— Fastställande av storheten flyktig syra. Tillämpas på flyktiga syror.
— Gaskromatografi. Tillämpas på aldehyder (etanal och acetal), etylacetat samt alkoholer.

2. **Gaskromatografisk analys av flyktiga ämnen**

Gaskromatografisk analys av andra flyktiga ämnen än de som anges ovan kan vara en användbar metod för att fastställa såväl ursprunget för det råmaterial som används vid destilleringen som de faktiska betingelserna för destilleringen.

Vissa spritdrycker innehåller andra flyktiga beståndsdelar, till exempel aromatiska ämnen, som sätter sin prägel på spritdryckens arom. Förekomsten av dessa ämnen förklaras dels av de råvaror som använts vid framställningen, dels av själva framställningsmetoden. Dessa ämnen är också av betydelse när det gäller uppfyllandet av kraven i förordning (EEG) nr 1576/89.

III.2 GASKROMATOGRAFISK BESTÄMNING AV FLYKTIGA KONGENER: ALDEHYDER, HÖGRE ALKOHOLER, ETYLACETAT OCH METANOL

1. **Omfattning**

Metoden avser bestämning av 1,1-dietoxietan (acetal), 2-metylbutan-1-ol (amylalkohol), 3-metylbutan-1-ol (isoamylalkohol), metanol (metylalkohol), etyletanoat (etylacetat), butan-1-ol (n-butanol), butan-2-ol (sec-butanol), 2-metylpropan-1-ol (isobutylalkohol), propan-1-ol (n-propanol) och etanal (acetaldehyd) i spritdrycker genom gaskromatografi. Vid bestämningen används en inre standard, till exempel pentan-3-ol. Analyternas koncentration uttrycks i g/100 liter absolut alkohol. Produktens alkoholhalt skall bestämmas innan analysen påbörjas. De spritdrycker som kan analyseras med denna metod är bland annat whisky, konjak, rom, vinsprit, fruktbrännvin och sprit tillverkad av druvrester.

2. **Referenser**

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

3. **Definition**

Kongener är flyktiga ämnen som bildas tillsammans med etanol vid spritdryckers jäsning, destillering och mognad.

4. **Princip**

Bestämning av kongener i spritdrycker görs genom att spriten, i spädd eller outspädd form, injiceras i ett gaskromatografiskt system (GC-system). Före injektion blandas spriten med en lämplig inre standard. Kongenerna i provet separeras genom att provet körs genom en lämplig kolonn enligt ett särskilt temperaturschema. För den kvalita-

▼B

tiva bestämningen används en flamjonisationsdetektor. Koncentrationen av varje kongen bestäms utifrån de responsfaktorer som erhålls vid en kalibrering med inre standard under förhållanden som är identiska med de som rådde vid analysen av spritdrycken.

5. **Reagens och material**

Om inte något annat anges skall de reagens som används ha en högre renhetsgrad än 97 %, vara inköpta hos en ISO-godkänd leverantör och dessutom åtföljas av ett intyg beträffande renhetsgraden. Det skall vid en testspädning inte gå att påvisa några andra kongener. (Detta kan bekräftas genom injektion – under de förhållanden som anges i 6.4 – av enskilda kongen-standarder som genomgått testspädning.) Det vatten som används skall hålla minst klass 3 enligt definitionen i ISO 3696. Acetal och acetaldehyd skall lagras i mörker vid < 5 ºC. Övriga reagens kan förvaras vid rumstemperatur.

5.1 Absolut alkohol (CAS 64-17-5).

5.2 Metanol (CAS 67-56-1).

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

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

5.5 Godkända inre standarder: pentan-3-ol, (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-metylpentan-1-ol (CAS 626-89-1) eller metylnonanoat (CAS 1731-84-6).

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

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

5.8 Etylacetat (CAS 141-78-6).

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

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

5.11 Acetaldehyd (CAS 75-07-0).

5.12 Acetal (CAS 105-57-7).

5.13 Etanollösning, 40 vol- %.

Bered 400 ml/l etanollösning genom att blanda 400 ml etanol (5.1) i en mätkolv på 1 l, fyll på med 600 ml destillerat vatten och blanda väl.

5.14 Beredning och lagring av standardlösningar (förfarande för validerad metod).

Alla standardlösningar skall lagras vid < 5 ºC och nya lösningar skall beredas varje månad. Vikten av olika ämnen och lösningar skall noteras med en noggrannhet av 0,1 mg.

5.14.1 Standardlösning A

Pipettera över reagenset nedan till en 100 ml mätkolv som dessförinnan fyllts med omkring 60 ml etanollösning (5.13) för att minimera avdunstningen. Späd till märket med etanollösning (5.13) och blanda omsorgsfullt. Notera vikten för själva kolven, vart och ett av de tillsatta ämnena samt de tillsatta ämnenas sammanlagda vikt.

Ämne	Volym (ml)
Metanol (5.2)	3,0
Propan-1-ol (5.3)	3,0
2-metylpropan-1-ol (5.4)	3,0
2-metylbutan-1-ol (5.6)	3,0
3-metylbutan-1-ol (5.7)	3,0
Etylacetat (5.8)	3,0
Butan-1-ol (5.9)	3,0
Butan-2-ol (5.10)	3,0
Acetaldehyd (5.11)	3,0
Acetal (5.12)	3,0

Anmärkning 2: Acetal och acetaldehyd bör tillsättas sist för att förlusterna genom avdunstning skall bli så små som möjligt.

▼B

5.14.2 Standardlösning B

Pipettera över 3 ml pentan-3-ol eller någon annan lämplig inre standard (5.5) till en 100 ml mätkolv som innehåller omkring 80 ml etanollösning (5.13). Späd till märket med etanollösning (5.13) och blanda omsorgsfullt.

Notera kolvens vikt, vikten av den inre standard som använts (pentan-3-ol etc.) samt de tillsatta ämnenas sammanlagda vikt.

5.14.3 Standardlösning C

Pipettera över 1 ml av lösning A (5.14.1) och 1 ml av lösning B (5.14.2) till en 100 ml mätkolv som innehåller omkring 80 ml etanollösning (5.13). Späd till märket med etanollösning (5.13) och blanda omsorgsfullt.

Notera vikten av själva kolven, vart och ett av de tillsatta ämnena samt de tillsatta ämnenas sammanlagda vikt.

5.14.4 Standardlösning D

För att möjliggöra kontinuitet i analysen, bered en kontrollstandardlösning utifrån den tidigare beredda standarden A (5.14.1). Pipettera över 1 ml av lösning A (5.14.1) till en 100 ml mätkolv som innehåller ungefär 80 ml etanollösning (5.13). Späd till märket med etanollösning (5.13) och blanda omsorgsfullt.

Notera vikten av själva kolven, vart och ett av de tillsatta ämnena samt de tillsatta ämnenas sammanlagda vikt

5.14.5 Standardlösning E

Pipettera över 10 ml lösning B (5.14.2) till en 100 ml mätkolv som innehåller omkring 80 ml etanollösning (5.13). Späd till märket med etanollösning (5.13) och blanda omsorgsfullt.

Notera vikten av själva kolven, vart och ett av de tillsatta ämnena samt de tillsatta ämnenas sammanlagda vikt.

5.14.6 Standardlösningar för att kontrollera att flamjonisationsdetektorns respons är linjär.

Pipettera över 0, 0,1, 0,5, 1,0 respektive 2,0 ml av lösning A (5.14.1) samt 1 ml av lösning B (5.14.2) till separata 100 ml mätkolvar som innehåller omkring 80 ml etanol (5.13). Späd till märket med etanollösning (5.13) och blanda omsorgsfullt.

Notera vikten av själva kolven, vart och ett av de tillsatta ämnena samt de tillsatta ämnenas sammanlagda vikt.

5.14.7 QC-standardlösning

Pipettera över 9 ml av standardlösning D (5.14.4) och 1 ml av standardlösning E (5.14.5) till ett kärl för vägning. Blanda omsorgsfullt.

Notera vikten av själva kolven, vart och ett av de tillsatta ämnena samt de tillsatta ämnenas sammanlagda vikt.

6. **Utrustning**

6.1 Instrument för mätning av densitet och alkoholhalt.

6.2 Analysvåg som kan ange värden med fyra decimalers noggrannhet.

6.3 Temperaturprogrammerad gaskromatograf som är ansluten till en flamjonisationsdetektor och en integrator eller till andra databehandlingssystem med vars hjälp toppareor eller topphöjder kan mätas.

6.4 Gaskromatografisk(a) kolonn(er) som kan separera analyterna så att den lägsta upplösningen mellan skilda ämnen (utom 2-metylbutan-1-ol och 3-metylbutan-1-ol) blir åtminstone 1,3.

Anmärkning 3: Följande kolonner, temperaturer etc. har visat sig vara lämpliga:

1. ”Retention gap” med dimensionerna 1 m × 0,32 mm i.d. som ansluts till en kolonn av typen CP-WAX 57 CB med dimensionerna 50 m × 0,32 mm i.d. som är belagd med en film av tjockleken 0,2 μm (stabiliserad polyetylenglykol) följt av en Carbowax 400-kolonn på 50 m × 0,32 mm i.d. och med 0,2 μm filmtjocklek. (Kolonnerna kopplas ihop med hjälp av press-fit-anslutningar).

Bärgas och tryck: Helium (135 kPa)

▼B

Kolonntemperatur:	35 ºC i 17 min. Öka därefter med 12 ºC/min. till 70 ºC. Bibehåll denna temperatur i 25 min.
Injektortemperatur:	150 ºC
Detektortemperatur:	250 ºC
Injektionsvolym:	1 µl, split 20–100:1

2. ”Retention gap” med dimensionerna 1 m × 0,32 mm i.d. som ansluts till en kolonn av typen CP-WAX 57 CB med dimensionerna 50 m × 0,32 mm i.d. som är belagd med en film av tjockleken 0,2 µm (stabiliserad polyetylenglykol). (”Retention gap” kopplas ihop med kolonnen med hjälp av en press-fit-anslutning).

Bärgas och tryck:	Helium (65 kPa)
Kolonntemperatur:	35 ºC i 10 min. Öka med 5 ºC/min. till 110 ºC. Öka därefter med 30 ºC/min. till 190 ºC. Bibehåll denna temperatur i 2 min.
Injektortemperatur:	260 ºC
Detektortemperatur:	300 ºC
Injektionsvolym:	1 µl, split 55:1

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

Kolonntemperatur:	65 ºC i 4 min. Öka med 10 ºC/min. till 140 ºC. Bibehåll denna temperatur i 5 min. Öka därefter med 5 ºC/min. till 150 ºC. Bibehåll denna temperatur i 3 min.
Injektortemperatur:	65 ºC
Detektortemperatur:	200 ºC
Injektionsvolym:	1 µl

7. **Insamling och förvaring av prov**

7.1 Laboratorieprov.

Då proverna kommer till laboratoriet skall alkoholhalten i varje prov mätas (6.1).

8. **Utförande (förfarande för validerad metod)**

8.1 Testportion.

8.1.1 Väg ett vägningskärl som först förslutits på lämpligt sätt. Notera vikten.

8.1.2 Pipettera över 9 ml av laboratorieprovet till kärlet och notera vikten (M_{PROV}).

8.1.3 Tillsätt 1 ml av standardlösning E (5.14.5) och notera vikten (M_{IS}).

8.1.4 Skaka provet kraftigt (genom att vända det upp och ned minst 20 gånger). För att förlusterna genom avdunstning skall bli så små som möjligt skall provet före analys förvaras vid en lägre temperatur än 5 ºC.

8.2 Blankprov

8.2.1 Använd en våg som anger resultat med fyra decimalers noggrannhet (6.2). Väg det förslutningsbara uppvägningskärlet och notera vikten.

8.2.2 Pipettera över 9 ml 40 %-ig etanollösning (5.13) till kärlet och notera vikten.

▼B

8.2.3 Tillsätt 1 ml av standardlösning E (5.14.5) och notera vikten.

8.2.4 Testmaterialet skakas omsorgsfullt (genom att kärlet vänds upp och ned minst 20 gånger). För att minimera förlusterna genom avdunstning skall provet före analys ha förvarats vid en lägre temperatur än 5 ºC.

8.3 Preliminärt test

Injicera standardlösning C (5.14.3) för att kontrollera att alla analyter separeras med en minsta upplösning på 1,3 (utom 2-metylbutan-1-ol och 3-metylbutan-1-ol).

8.4 Kalibrering

Kalibreringen skall kontrolleras på följande sätt: Gör en successiv trippelanalys av samtliga standardlösningar (5.14.6) som innehåller den inre standarden (IS) för att kontrollera att responsen är linjär. Beräkna kvoten R för varje kongen med hjälp av de toppareor eller topphöjder som erhålls från integratorn efter varje injektion. Rita en kurva där R avsätts mot koncentrationskvoten C mellan kongen och inre standard (IS). Resultatet skall bli en linjär kurva med en korrelationskoefficient på åtminstone 0,99.

$$R = \frac{\text{Topparea eller -höjd för kongen}}{\text{Topparea eller -höjd för IS}}$$

$$C = \frac{\text{Koncentration av kongen (µg/g)}}{\text{Koncentration av IS (µg/g)}}$$

8.5 Bestämning

Injicera standardlösning C (5.14.3) och 2 volymer QC-standardlösning (5.14.7). Injicera därefter de prov som skall bestämmas (beredning enligt 8.1 och 8.2) i omgångar om tio prov. Efter vart tionde prov injiceras en volym QC-standardlösning för att de analytiska förhållandena skall hålla sig stabila. Efter vart femte prov injiceras också en volym standardlösning C (5.14.3).

9. **Beräkning av resultat**

Ett automatiskt system för databehandling kan användas förutsatt att erhållna data kan kontrolleras enligt de principer som anges i metodbeskrivningen nedan.

Mät antingen arean eller höjden för de toppar som svarar mot kongenen och den inre standarden.

9.1 Beräkning av responsfaktorn.

Beräkna utifrån kromatogrammet från injektionen av standardlösning C (5.14.3) responsfaktorn för varje kongen med hjälp av formel 1.

$$1)\ \text{Responsfaktor} = \frac{\text{Topparea eller -höjd, IS}}{\text{Topparea eller -höjd, kongen}} \times \frac{\text{Konc. kongen (µg/g)}}{\text{Konc. IS (µg/g)}}$$

där:

IS = inre standard

Konc. kongen = koncentrationen av kongen i lösning C (5.14.3)

Konc. IS = koncentrationen av inre standard i lösning C (5.14.3).

9.1.2 Analys av provet

Beräkna koncentrationen av varje kongen i proven med hjälp av formel 2 nedan:

$$2)\ \text{Koncentration av kongen (µg/g)} = \frac{\text{Topparea eller -höjd, kongen}}{\text{Topparea eller -höjd, IS}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{M_{PROV}\ (g)} \times \text{Konc. IS (µg / g)} \times RF$$

▼B

där:

M_{PROV} = provets vikt (8.1.2)

M_{IS} = den inre standardens vikt (8.1.3)

Konc. IS = koncentrationen av inre standard i lösning E (5.14.5)

RF = responsfaktor som räknats fram med hjälp av formel 1

9.1.3 Analys av standardlösningen för att kontrollera kvaliteten

Beräkna med hjälp av formel 3 nedan det procentuella utbytet i förhållande till målvärdet för varje kongen i kontrollstandardlösningarna (5.14.7):

$$3)\ \text{Utbyte (\%) för QC-provet} = \frac{\text{koncentration av analyt i QC-standard}}{\text{koncentration av analyt i lösning D}} \times 100$$

Analyternas koncentration i QC-standarden beräknas med hjälp av formlerna 1 och 2 ovan.

9.2 Slutlig resultatredovisning

Resultaten omvandlas från µg/g till g/100 liter absolut alkohol med hjälp av formel 4:

$$4)\ \text{Konc. (g/100 liter absolut alkohol)} =$$

$$\text{Konc. (µg/g)} \times \rho \times 10/(\text{alkoholhalt <(vol-\%)} \times 1\ 000)$$

där

ρ = densiteten i kg/m^3.

Resultaten skall anges med tre gällande siffror och högst en decimal, t.ex. 11,4 g/100 l absolut alkohol.

10. **Kvalitetssäkring och kontroll (för validerad metod)**

Räkna med hjälp av formel 2 ovan fram koncentrationen av varje kongen i de kontrollstandardlösningar som bereds enligt 8.1.1–8.1.4. Beräkna med hjälp av formel 3 det procentuella utbytet i förhållande till målvärdet. Om det analyserade resultatet motsvarar det teoretiska värdet för varje kongen ± 10 % kan analysen fortsätta. Om detta inte är fallet bör orsaken till avvikelsen undersökas och lämpliga åtgärder vidtas.

11. **Metodutvärdering (noggrannhet)**

Statistiska resultat från provningsjämförelsen: I följande tabeller redovisas värden för följande ämnen: etanol, etylacetat, acetal, totalt etanol, metanol, butan-2-ol, propan-1-ol, butan-1-ol, 2-metanol-1-ol, 2 metyl-butan-1-ol, 3 metyl-butan-1-ol.

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden.

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	etanal

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	28	26	27	27	28
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	2	4	3	3	2
Antal godkända resultat	56	52	54	54	56

▼B

Prov	A	B	C	D	E
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8 (*)	28,6 52,2 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	etylacetat

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	24	24	25	24	24
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	2	2	1	2	2
Antal godkända resultat	48	48	50	48	48
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

▼B

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	acetal

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	20	21	22	17	21
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	4	3	2	4	3
Antal godkända resultat	40	42	44	34	42
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60 (*)	15,1 28,3 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	etanal (totalhalt)

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	23	19	22	21	22
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	1	5	2	3	2
Antal godkända resultat	46	38	44	42	44
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8 (*)	32,7 61,8 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1

▼B

Prov	A	B	C	D	E
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

År då provningsjämförselsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	metanol

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	26	27	27	28	25
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	4	3	3	1	4
Antal godkända resultat	52	54	54	56	50
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

År då provningsjämförselsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	4
Analyt	butan-2-ol

Prov	A	B	C	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	21	27	29	22
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	4	3	1	3
Antal godkända resultat	42	54	58	44

▼B

Prov	A	B	C	E
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
E Rom, ”split level” (*).

År då provningsjämförselsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	propan-1-ol

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	29	27	27	29	29
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	2	4	3	2	2
Antal godkända resultat	58	54	54	58	58
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	butan-1-ol

▼B

Prov	A	B	C
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	20	22	22
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	4	4	6
Antal godkända resultat	40	44	44
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	0,43	0,20	0,43
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök (*).

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	2-metylpropan-1-ol

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	28	31	30	26	25
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	3	0	1	5	6
Antal godkända resultat	56	62	60	52	50
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0 246,8 (*)	115,99 133,87 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

▼B

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	2-metyl-butan-1-ol

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	25	26	25	27	25
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	3	2	3	1	2
Antal godkända resultat	50	52	50	54	50
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2 (*)	39,5 61,5 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	32
Antal prov	5
Analyt	3-metyl-butan-1-ol

Prov	A	B	C	D	E
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	23	23	24	27	21
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	5	5	4	1	6
Antal godkända resultat	46	46	48	54	42
Medelvärde ($\bar{x}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Standardavvikelse, repeterbahret (S_r) µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Repeterbarhetsgräns (r) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9

▼B

Prov	A	B	C	D	E
Reproducerbarhetsgräns (R) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Provtyper:
A Konjak, dubbel-blind-försök.
B Kirsch, dubbel-blind-försök.
C Grappa, dubbel-blind-försök.
D Whisky, ”split level” (*).
E Rom, ”split level” (*).

▼M1

V. ANETOL. GASKROMATOGRAFISK BESTÄMNING AV TRANS-ANETOL I SPRITDRYCKER

1. Tillämpningsområde

Metoden används för att med hjälp av kapillär gaskromatografi bestämma koncentrationen av trans-anetol i spritdrycker smaksatta med anis.

2. Referenser

ISO 3696:1987 Vatten för analys - Krav och provningsmetoder

3. Princip

Koncentrationen av trans-anetol i spritdrycken bestäms med gaskromatografi (GC). Samma kvantitet av en inre standard, t.ex. 4-allylanisol (estragol) när ingen estragol finns naturligt i provet, sätts till provet och till en referenslösning med känd koncentration av trans-anetol. Båda späds sedan med en 45-procentig etanollösning och sprutas direkt in i GC-systemet. För likörer som innehåller höga halter av socker krävs extration innan provet förbereds och analyseras.

4. Reagens och material

Vid analysen skall endast reagens med en renhetsgrad på minst 98 % användas. Vatten med en renhetsgrad av minst 3 enligt ISO 3696 skall användas.

Referenskemikalierna bör lagras kallt (cirka 4 ºC), skyddade från ljus, i aluminiumbehållare eller i färgade (bruna) reagensflaskor av glas. Propparna bör helst förseglas med aluminium. Trans-anetolen måste ”tinas” från kristallform före användning, men temperaturen får då aldrig överskrida 35 ºC.

4.1. Etanol, 96 % (vol.) (CAS 64-17-5)

4.2. 1-metoxi-4-(1-propenyl)-bensen (trans-anetol) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-allylanisol (estragol) (CAS 140-67-0), föreslagen inre standard (IS)

4.4. Etanol, 45 % (vol.)

Tillsätt 560 g destillerat vatten till 378 g 96-procentig etanol (vol.).

4.5. Beredning av standardlösningar

Alla standardlösningar bör förvaras i rumstemperatur (15-35 ºC), skyddade från ljus, i aluminiumbehållare eller i färgade (bruna) reagensflaskor av glas. Proppen bör helst förseglas med aluminium.

Trans-anetol och 4-allylanisol är praktiskt taget olösliga i vatten och måste därför lösas upp i lite 96-procentig etanol (4.1) innan 45-procentig etanol (4.4) tillsätts.

Nya stamlösningar måste beredas varje vecka.

4.5.1. Standardlösning A

Stamlösning av trans-anetol (koncentration: 2 g/l)

Väg upp 40 mg trans-anetol (4.2) i en 20 ml mätkolv (eller 400 mg i en 200 ml mätkolv etc.). Tillsätt 96-procentig etanol (4.1) och späd till märket med 45-procentig etanol (4.4). Blanda omsorgsfullt.

4.5.2. Standardlösning B, inre standard

Stamlösning av inre standard, t.ex. estragol (koncentration: 2 g/l)

Väg upp 40 mg estragol (4.3) i en 20 ml mätkolv (400 mg i en 200 ml mätkolv etc.). Tillsätt 96-procentig etanol (4.1) och späd till märket med 45-procentig etanol (4.4). Blanda omsorgsfullt.

4.5.3. Lösningar för att kontrollera att flamjonisationsdetektorns respons är linjär

En kontroll av att flamjonisationsdetektorns respons är linjär måste göras för analysen med beaktande av olika koncentrationer av trans-anetol i sprit, mellan 0 g/l upp till 2,5 g/l. Vid analysförfarandet skall de okända proven som skall analyseras spädas tio gånger (8.3). För villkoren för den analys som anges i metoden skall standardlösningar, som motsvarar koncentrationer på 0; 0,05; 0,1; 1,15; 0,2 respektive 0,25 g/l av trans-anetol i det prov som skall analyseras, förberedas

▼M1

på följande sätt: Mät upp 0,5; 1; 1,5; 2 och 2,5 ml av standardlösning A (4.5.1) och för över till i mätkolvar som rymmer 20 ml. Pipettera upp 2 ml inre standardlösning B (4.5.2) i varje mätkolv och späd till märket med 45-procentig etanol (4.4). Blanda omsorgsfullt.

Blanklösningarna (8.4) skall användas på samma sätt som 0 g/l-lösningen.

4.5.4. Standardlösning C

Pipettera upp 2 ml av standardlösning A (4.5.1) i en 20 ml mätkolv, tillsätt sedan 2 ml inre standardlösning B (4.5.2) och späd till märket med 45-procentig etanol (4.4). Blanda omsorgsfullt.

5. **Utrustning**

5.1. En kapillär gaskromatograf med flamjonisationsdetektor (FID) och integrator eller annat databehandlingssystem för mätning av topphöjder och toppareor och med automatisk provväxlare eller den utrustning som krävs för manuell injektion.

5.2. Injektor av typen splitless/split

5.3. Kapillärkolonn, till exempel:

Längd: 50 m

Inre diameter: 0,32 mm

Filmtjocklek: 0,2 μm

Stationär fas: FFAP - modifierad TPA-polyetylenglykol, en tvärbunden porös polymer

5.4. Vanlig laboratorieutrustning: mätkolvar av klass A, analysvåg (noggrannhet: ± 0,1 mg).

6. **Betingelser för gaskromatografi**

Kolonntypen, kolonnens dimensioner och GC-betingelserna bör vara sådana att anetol och inre standard separeras från varandra och från eventuella interfererande ämnen. Typiska data för exempelkolonnen i 5.3 är:

6.1. Bärgas: analytiskt ren helium

6.2. Flödeshastighet: 2 ml/min

6.3. Injektortemperatur: 250 ºC

6.4. Detektortemperatur: 250 ºC

6.5. Data för ugnstemperatur: isotermisk, 180 ºC, körtid 10 minuter

6.6. Injektionsvolym: 1 μl, split 1:40

7. **Prov**

Proven skall förvaras i rumstemperatur, skyddade mot ljus och kyla.

8. **Utförande**

8.1. Kontroll av estragol i proven

För att kontrollera att ingen estragol finns naturligt i provet skall ett blankprov analyseras utan tillsats av inre standard. Om estragol finns naturligt i provet måste en annan inre standard väljas (t.ex. mentol).

Pipettera upp 2 ml prov i en 20 ml mätkolv och späd till märket med 45-procentig etanol (4.4). Blanda omsorgsfullt.

8.2. Beredning av okända prov

Pipettera upp 2 ml prov i en 20 ml mätkolv, tillsätt 2 ml inre standardlösning B (4.5.2) och späd till märket med 45-procentig etanol (4.4). Blanda omsorgsfullt.

8.3. Blankprov

Pipettera upp 2 ml inre standardlösning B (4.5.2) i en 20 ml mätkolv och späd till märket med 45-procentig etanol (4.4). Blanda omsorgsfullt.

▼M1

8.4. Test av linjär respons

Innan analysen påbörjas skall man kontrollera att flamjonisationsdetektorns respons är linjär genom att tre identiska prov av var och en av standardlösningarna (4.5.3) analyseras.

Använd integratorns topphöjder eller toppareor för att konstruera en kurva med stamlösningens koncentration i g/l mot kvoten R för varje prov.

R = topphöjden eller topparean för trans-anetol dividerat med topphöjden respektive topparean för estragol.

En rät linje skall erhållas.

8.5. Bestämning

Injicera först blanklösningen (8.4), sedan standardlösning C (4.5.4) och därefter en av standardlösningarna för linearitetstest (4.5.3), som kommer att fungera som en kvalitetskontroll (standardlösningen kan väljas efter den troliga koncentrationen av trans-anetol i det okända provet). Injicera slutligen fem okända prov (8.3). Injicera ett linearitetsprov (kvalitetskontroll) efter vart femte okänt prov för att kontrollera att analyskvaliteten är jämn.

9. **Beräkning av responsfaktor**

Mät antingen topparea (med en integrator eller andra datasystem) eller topphöjd (manuell integration) för trans-anetol och inre standard.

9.1. Beräkning av responsfaktor (RF_i)

Responsfaktorn beräknas på följande sätt:

RFi = (Ci/area eller höjdi)*(area eller höjd is/Cis)

där

C_i är koncentrationen av trans-anetol i standardlösning A (4.5.1)

C_{is} är koncentrationen av inre standard i standardlösning B (4.5.2)

area $_i$ är topparean (eller topphöjden) för trans-anetol

$area_{is}$ är topparean (eller topphöjden) för den inre standarden

RF_i beräknas från fem prov av lösning C (4.5.4)

9.2. Analys av lösningarna för linearitetstest

Injicera testlösningarna för linearitet (4.5.3).

9.3. Analys av provet

Injicera det okända provet (8.2)

10. **Resultatberäkning**

Använd följande formel för att beräkna koncentrationen av trans-anetol:

ci = Cis * (area eller höjdi/area eller höjdis)*RFi

där

c_i är koncentrationen av trans-anetol i det okända provet

C_{is} är koncentrationen av inre standard i det okända provet (4.5.2)

Area eller $höjd_i$ är topparean eller topphöjden för trans-anetol

Area eller $höjd_{is}$ är topparean eller topphöjden för den inre standarden

RF_i är responskoefficienten (beräknad enligt 9.1)

Koncentrationen av trans-anetol uttrycks i gram per liter, med en decimals noggrannhet.

11. **Kvalitetssäkring och kvalitetskontroll**

I kromatogrammen skall anetol och inre standard vara åtskilda från varandra och från eventuella interfererande ämnen. RF_i-värdet beräknas från resultatet av fem injektioner av lösning C (4.5.4). Om variationskoefficienten (CV % = (standardavvikelse/medelvär-

▼M1

de) * 100)) ligger inom ± 1 % är genomsnittsvärdet för RF_i godtagbart.

Beräkningen ovan skall användas för att få fram koncentrationen av trans-anetol i det prov av linearitetslösningarna (4.5.3) som valts ut för kvalitetskontroll.

Om de genomsnittliga beräknade resultaten från analysen av den linearitetslösning som valts ut som prov för intern kvalitetskontroll (IQC) ligger inom ± 2,5 % av de teoretiska värdena kan resultaten för de okända proven godtas.

12. **Behandling för GC-analys av prov av sprit med högt sockerinnehåll och av prov av likörer**

Extraktion av alkohol från en sockerrik spritdryck för att det skall gå att bestämma koncentrationen av trans-anetol med kapillär gaskromatografi.

12.1. Princip

En alikvot tas ut av provet från likören och till denna tillsätts inre standard i en koncentration motsvarande analytkoncentrationen (koncentrationen av trans-anetol) i likören. Till detta tillsätts natriumfosfat-12-hydrat och vattenfritt ammoniumsulfat. Denna blandning skakas väl och kyls, varvid två skikt bildas. Det övre skiktet, som består av alkohol, avlägsnas. En alikvot av detta alkoholskikt tas ut och späds med 45-procentig etanol (4.4) (Anm: ingen inre standard tillsätts i detta skede, eftersom sådan redan har tillsatts). Den lösning som erhålls analyseras med gaskromatografi.

12.2. Reagens och material

Vid extraktionen skall man endast använda reagens med en renhetsgrad på över 99 %.

12.2.1. Vattenfritt ammoniumsulfat (CAS 7783-20-2)

12.2.2. Dibasisk natriumfosfat-12-hydrat (CAS 10039-32-4)

12.3. Utrustning

E-kolvar, separerkolvar, kylningsutrustning.

12.4. Utförande

12.4.1. Kontroll av estragol i proven

För att kontrollera att ingen estragol finns naturligt i provet skall extraktion (12.6.2) av ett blankprov göras utan tillsats av inre standard. Om estragol finns naturligt i provet måste en annan inre standard väljas.

12.4.2. Extraktion

Pipettera upp 5 ml 96-procentig etanol (4.1) i en E-kolv, väg upp 50 mg inre standard (4.3) i E-kolven och tillsätt 50 ml prov. Tillsätt 12 g vattenfritt ammoniumsulfat (12.2.1) och 8,6 g dibasisk natriumfosfat-12-hydrat (12.2.2). Sätt propp i E-kolven.

Skaka E-kolven i minst 30 minuter. En mekanisk skak får användas, men inte en magnetomrörare med teflonhölje, eftersom teflonet absorberar en del av analyten. Observera att de tillsatta salterna inte löses upp helt.

Låt den tillslutna E-kolven stå i kylskåp (T < 5 ºC) i minst två timmar.

Efter två timmar skall det finnas två distinkta skikt och en fast fällning. Alkoholskiktet skall ha klarnat. Om så inte är fallet, ställ tillbaka E-kolven i kylskåpet tills all grumling är borta och skikten är helt åtskilda.

När alkoholskiktet har klarnat tar man försiktigt ut en alikvot (t.ex. 10 ml) utan att röra vattenskiktet, häller upp den i ett mörkfärgat kärl och tillsluter detta ordentligt.

12.4.3. Beredning av det extraherade provet för analys

Låt extraktet (12.4.2) anta rumstemperatur.

Ta ut 2 ml av alkoholskiktet i det tempererade provet och pipettera upp det i en 20 ml mätkolv. Späd till märket med 45-procentig etanol (4.4) och blanda omsorgsfullt.

▼M1

12.5. Bestämning

Följ anvisningarna i 8.5.

12.6. Resultatberäkning

Använd följande formel för att beräkna resultaten:

$Ci = (mis/V) * (areai/areais) * RFi$

där

m_{is} är den inre standardens (4.3) vikt (12.4.2) (i mg)

V är det okända provets volym (50 ml)

RF_i är responsfaktorn (9.1)

$area_i$ är topparean för trans-anetol

$area_{is}$ toppenarean för den inre standarden

Resultaten uttrycks i g/l, med en decimals noggrannhet.

12.7. Kvalitetskontroll och kvalitetssäkring

Följ anvisningarna i punkt 11.

13. **Metodutvärdering (noggrannhet)**

Statistiska resultat från provningsjämförelsen:

Värdena för anetol anges i tabellerna nedan.

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden.

År då provningsjämförelsen gjordes	1998
Antal laboratorier	16
Antal prov	10
Analyt	anetol

Pastis:

Prov	A	B	C	D	E	F
Antal laboratorier efter eliminering av sådana med avvikande mätvärden	15	15	15	13	16	16
Antal laboratorier med avvikande mätvärden	1	1	1	3	—	—
Antal godkända resultat	30	30	30	26	16	16
Medelvärde g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Repeterbarhetsgräns (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Reproducerbarhetsgräns (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Provtyper:

A Pastis, dubbelblindprov

B Pastis, dubbelblindprov

C Pastis, dubbelblindprov

D Pastis, dubbelblindprov

E Pastis, ett prov

F Pastis, ett prov

▼**M1**

Andra spritdrycker smaksatta med anis:

Prov	G	H	I	J
Antal laboratorier efter eliminering av sådana med avvikande mätvärden	16	14	14	14
Antal laboratorier med avvikande mätvärden	—	2	1	1
Antal godkända resultat	32	28	28	28
Medelvärde g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Repeterbarhetsgräns (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Reproducerbarhetsgräns (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Provtyper:

G Ouzo, ”split levels” (*)

H Anis, dubbelblindprov

I Likör smaksatt med anis, dubbelprov

J Likör smaksatt med anis, dubbelprov

▼M1

VI. GLYCYRRHIZINSYRA. BESTÄMNING AV GLYCYRRHIZINSYRA MED HPLC

1. **Tillämpningsområde**

Metoden används för att med hjälp av HPLC bestämma koncentrationen av glycyrrhizinsyra i spritdrycker smaksatta med anis. Enligt förordning (EEG) nr 1576/89 skall alla spritdrycker smaksatta med anis som går under benämningen ”pastis” innehålla mellan 0,05 och 0,5 g glycyrrhizinsyra per liter.

2. **Referenser**

ISO 3696:1987 Vatten för analys – Krav och provningsmetoder

3. **Princip**

Koncentrationen av glycyrrhizinsyra bestäms med HPLC med UV-detektion. En standardlösning och provet filtreras och injiceras separat direkt i HPLC-systemet.

4. **Reagens och material**

Vid analysen skall endast reagens av HPLC-kvalitet, absolut etanol och vatten av klass 3 enligt ISO 3696 användas.

4.1. 96-procentig etanol (vol.) (CAS 64-17-5)

4.2. Ammoniumglycyrrhizinat, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (ammoniumsaltet av glycyrrhizinsyra)

(Molekylvikt 839,98) (CAS 53956-04-0): renhet minst 90 %

(Molekylvikt för glycyrrhizinsyra 822,94)

4.3. Isättika, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.4. Metanol, CH_3OH, (CAS 67-56-1)

4.5. 50-procentig etanol (vol.)

För 1 000 ml vid 20ºC:

— 96-procentig etanol (4.1): 521 ml

— Vatten (2.0): 511 ml

4.6. Beredning av elueringslösningar för HPLC

4.6.1. Elueringslösning A (exempel):

80 delar (volym) vatten (2.0)

20 delar (volym) ättiksyra (4.3)

Avlufta elueringslösningen i fem minuter.

Anm. Om det vatten som används inte har mikrofiltrerats bör den färdigberedda elueringslösningen filtreras genom ett filter för organiska lösningsmedel med en porstorlek på högst 0,45 μm.

4.6.2. Elueringslösning B

Metanol (4.4)

4.7. Beredning av standardlösningar

Alla standardlösningar måste beredas på nytt efter två månader.

4.7.1. Referenslösning C

Väg upp 25 mg ammoniumglycyrrhizinat (4.2) till närmaste 0,1 mg i en 100 ml mätkolv. Tillsätt lite 50-procentig etanol (4.5) och lös upp ammoniumglycyrrhizinatet. När saltet har lösts, späd till märket med 50-procentig etanol (4.5).

Filtrera genom ett filter för organiska lösningsmedel.

4.7.2. Standardlösningar (används för att kontrollera att analysutrustningen ger en linjär respons)

Bered en 1,0 g/l stamlösning genom att väga upp 100 mg ammoniumglycyrrhizinat till närmaste 0,1 mg i en 100 ml mätkolv. Tillsätt lite 50-procentig etanol (4.5) och lös upp ammoniumglycyrrhizinatet. När saltet har lösts, späd till märket med 50-procentig etanol (4.5).

▼M1

Förbered minst fyra andra lösningar som motsvarar koncentrationer på 0,05; 0,1; 0,25 och 0,5 g/l ammoniumglycyrrhizinatet genom att pipettera upp 5 ml, 10 ml, 25 ml respektive 50 ml av 1,0 g/l-lösningen i separata 100 ml mätkolvar. Späd sedan till märket med 50-procentig etanol (4.5) och blanda omsorgsfullt.

Filtrera samtliga lösningar genom ett filter för organiska lösningsmedel.

5. **Utrustning**

5.1. Separationssystem

5.1.1. HPLC-system

5.1.2. Pumpsystem som ger ett konstant eller programmerat flöde med stor noggrannhet

5.1.3. Detektionssystem som bygger på UV-spektrofotometri: skall ställas in på 254 nm

5.1.4. Avluftningssystem för lösningsmedel

5.2. Integrator eller skrivare som är kompatibel med resten av systemet

5.3. Kolonn (exempel):

Material: rostfritt stål eller glas

Inre diameter: 4–5 mm

Längd: 100–250 mm

Stationär fas: tvärbunden silica med en (helst sfärisk) oktadekan (C18) som funktionell grupp, maximal partikelstorlek: 5 μm.

5.4. Laboratorieutrustning

5.4.1. Analysvåg med en noggrannhet på 0,1 mg

5.4.2. Mätkolvar av glas av A-klass

5.4.3. System för mikromembranfiltrering för små volymer

6. **Betingelser för kromatografi**

6.1. Elueringsdata (exempel):

— Flödeshastighet 1 ml/minut
— Lösningsmedel A = 30 %
— Lösningsmedel B = 70 %

6.2. Detektion:

— UV = 254 nm

7. **Utförande**

7.1. Beredning av prov

Filtrera vid behov genom ett filter för organiska lösningsmedel (pordiameter: 0,45 μm).

7.2. Bestämning

När kromatografibetingelserna är stabila:

— Injicera 20 μl av referenslösning C (4.7.1).
— Injicera 20 μl av provlösningen.
— Jämför de två kromatogrammen. Identifiera glycyrrhizinsyratopparna med hjälp av deras retentionstider. Mät deras area (eller höjd) och beräkna koncentrationen i g/l med två decimalers noggrannhet med följande formel:

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

▼M1

där

c är koncentrationen glycyrrhizinsyra i gram per liter i den spritdryck som analyseras,

C är koncentration ammoniumglycyrrhizinat i gram per liter i referenslösningen,

h är glycyrrhizinsyratoppens area (eller höjd) för den spritdryck som analyseras,

H är glycyrrhizinsyratoppens area (eller höjd) för referenslösningen,

P är renhetsgraden hos det ammoniumglycyrrhizinat som används som referens (i %),

823 är massan av en mol glycyrrhizinsyra,

840 är massan av en mol ammoniumglycyrrhizinat.

8. **Metodutvärdering (noggrannhet)**

Statistiska resultat från provningsjämförelsen:

Värdena för glycyrrhizinsyra anges i tabellen nedan.

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden.

År då provningsjämförelsen gjordes	1998
Antal laboratorier	16
Antal prov	5
Analyt	glycyrrhizinsyra

Prov	A	B	C	D	F
Antal laboratorier efter eliminering av sådana med avvikande mätvärden	13	14	15	16	16
Antal laboratorier med avvikande mätvärden	3	2	1	—	—
Antal godkända resultat	26	28	30	32	32
Medelvärde g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Repeterbarhetsgräns (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Reproducerbarhetsgräns (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Provtyper:

A Pastis, dubbelblindprov

B Pastis, ”split levels” (*)

C Pastis, dubbelblindprov

D Pastis, dubbelblindprov

E Pastis, dubbelblindprov

▼M1

VII. CHALKONER. HPLC-METOD FÖR KONTROLL AV NÄRVARON AV CHALKONER I PASTIS

1. **Tillämpningsområde**

Metoden används för att bestämma om drycker smaksatta med anis innehåller chalkoner. Chalkoner är naturliga flavonoidfärgämnen som finns i lakritsrot (*Glycyrrhiza glabra*).

För att en spritdryck smaksatt med anis skall få kallas ”pastis” måste den innehålla chalkoner (förordning (EEG) nr 1576/89).

2. **Referenser**

ISO 3696:1987 Vatten för analys – Krav och provningsmetoder

3. **Princip**

En referenslösning av extrakt av lakritsrot bereds. Närvaron eller frånvaron av chalkoner bestäms med HPLC med UV-detektion.

4. **Reagens och material**

Vid analysen skall endast reagens av HPLC-kvalitet användas. Etanolen skall vara 96-procentig (vol.). Endast vatten av klass 3 enligt ISO 3696 skall användas.

4.1. Etanol, 96 % (vol.) (CAS 64-17-5)

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

4.3. Referensämne: *Glycyrrhiza glabra*: (lakritsrot)

Grovmalen lakritsrot (*Glycyrrhiza glabra*). Genomsnittlig storlek på de stavformade partiklarna: längd: 10–15 mm; tjocklek: 1–3 mm.

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

4.5. Isättika, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.6. Beredning av lösningar

4.6.1. Etanol, 50 % (vol.)

För att bereda 1 000 ml vid 20 ºC:

— 96-procentig (vol.) etanol (4.1): 521 ml
— Vatten (2.0): 511 ml

4.6.2. Lösningsmedel A: acetonitril

Acetonitril (4.2) av HPLC-kvalitet

Avlufta

4.6.3. Lösningsmedel B: 0,1 M natriumacetatbuffert, pH 4,66

Väg upp 8,203 g natriumacetat (4.4), tillsätt 6,005 g isättika (4.5) och späd till 1 000 ml med vatten (2) i en mätkolv.

5. **Beredning av referensextrakt av *Glycyrrhiza glabra* (4.3)**

5.1. Väg upp 10 g mald lakritsrot (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) och för över till en destilleringsrundkolv.

— Tillsätt 100 ml 50-procentig etanol (4.6.1).
— Återloppskoka i en timme.
— Filtrera.
— Spara filtratet.

5.2. Ta vara på lakritsrotextraktet från filtret.

— Placera det i en destilleringsrundkolv.
— Tillsätt 100 ml 50-procentig etanol (4.6.1).
— Återloppskoka i en timme.
— Filtrera. Spara filtratet.

5.3. Extraktionen av lakritsrot skall göras tre gånger i följd.

5.4. Slå samman de tre filtraten.

5.5. Låt lösningsmedelsfasen (från 5.4) avdunsta i en rotationsindunstare.

▼M1

5.6. Lös resterande extrakt (från 5.5) i 100 ml 50-procentig etanol (4.6.1).

6. **Utrustning**

6.1. Separationssystem

6.1.1. HPLC-system

6.1.2. Pumpsystem som ger ett konstant eller programmerat flöde med stor noggrannhet

6.1.3. Spektrofotometriskt detektionssystem med UV/synligt ljus som kan ställas in på 254 och 370 nm

6.1.4. Avluftningssystem för lösningsmedel

6.1.5. Kolonnugn som kan ställas in på 40 ± 0,1 ºC.

6.2. Integrator eller skrivare som är kompatibel med resten av systemet.

6.3. Kolonn

Material: rostfritt stål eller glas

Inre diameter: 4–5 mm

Stationär fas: tvärbunden silica med en oktadekan (C18) som funktionell grupp, maximal partikelstorlek: 5 μm (tvärbunden fas).

6.4. Vanlig laboratorieutrustning, bland annat:

6.4.1. Analysvåg (noggrannhet: ± 0,1 mg)

6.4.2. Destillationsapparat med återloppskondensator, som består av exempelvis

— en 250 ml rundkolv med standardkoppling av slipat glas,

— en 30 cm lång återloppskondensator, och

— en värmekälla (utrustningen måste vara utformad så att pyrogena reaktioner med extraktet undviks).

6.4.3. Rotationsindunstare

6.4.4. Filtreringsanordning (Buchner-tratt)

6.5. Kromatografibetingelser (exempel):

6.5.1. Elueringsegenskaper hos lösningsmedlen A (4.6.2) och B (4.6.3)

— Gå från en gradient på 20/80 (v/v) till 50/50 (v/v) på femton minuter.

— Gå från en gradient på 50/50 (v/v) till 75/25 (v/v) på fem minuter.

— Håll samma koncentration 75/25 (v/v) i fem minuter.

— Stabilisering av kolonnen mellan injektioner:

— Samma koncentration, 20/80 (v/v), i fem minuter.

6.5.2. Flödeshastighet: 1 ml/minut

6.5.3. Inställning för UV-detektor:

Detektorn skall ställas in på 370 nm för detektion av chalkoner och sedan på 254 nm för bestämning av glycyrrhizinsyra.

Anm.: Ändringen av våglängd (från 370 nm till 254 nm) skall göras 30 sekunder innan toppen för glycyrrhizinsyra börjar komma.

7. **Utförande**

7.1. Beredning av prov

Filtrera genom ett filter för organiska lösningsmedel (pordiameter: 0,45 μm).

7.2. Beredning av resterande lakritsrotsextrakt (5.6)

Späd 1:10 med 50-procentig etanol (4.6.1) före analys.

7.3. Bestämning

7.3.1. Injicera 20 μl av det beredda lakritsrotsextraktet (7.2). Gör analysen under de kromatografibetingelser som beskrivs ovan (6.5).

7.3.2. Injicera 20 μl av provet (7.1) (prov av spritdryck smaksatt med anis). Gör analysen under de kromatografibetingelser som beskrivs ovan (6.5).

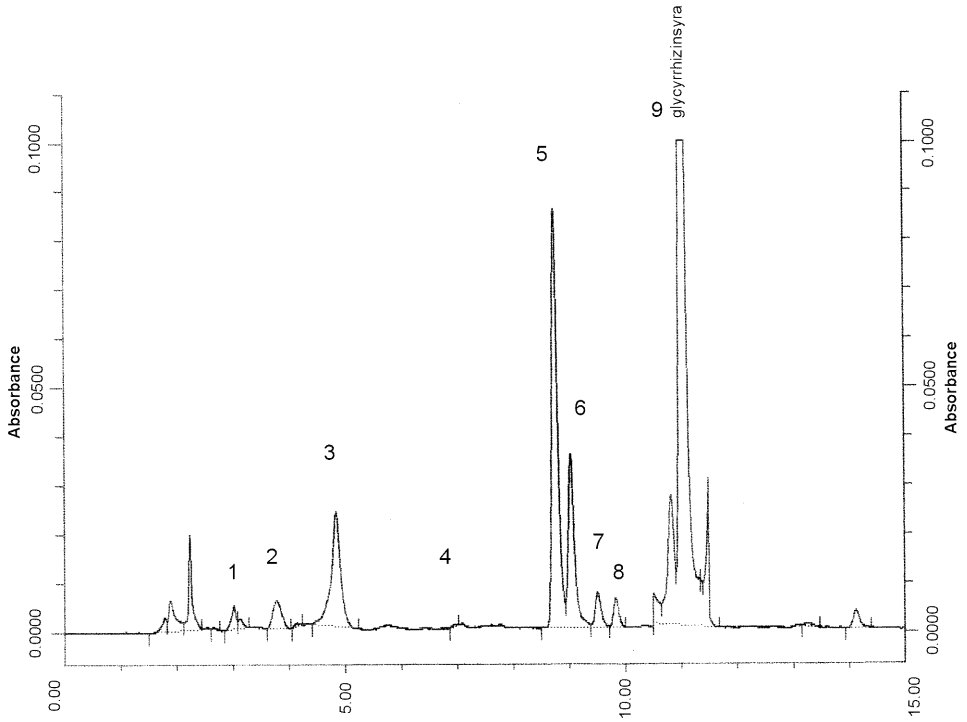
▼M1

7.3.3. Jämför de två kromatogrammen. Det skall finnas stora likheter mellan dem i slutzonen för chalkoner (vid detektion vid 370 nm under ovan beskrivna analysbetingelser) (se figur 1).

8. **Typiskt kromatogram för pastis**

Figur 1

Kromatogram erhållet med den ovan beskrivna metoden som visar att en pastis innehåller chalkoner. Topparna 1–8 är chalkoner och topp 9 glycyrrhizinsyra.



9. **Metodutvärdering (noggrannhet)**

Resultat från provningsjämförelsen:

Tabellen nedan visar resultaten av analyser avseende chalkoner i pastis och spritdrycker smaksatta med anis.

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden.

År då provningsjämförelsen gjordes	1998
Antal laboratorier	14
Antal prov	11
Analyter	chalkoner

Prov	A	B	C	D	E	F
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av sådana med avvikande mätvärden	14	14	14	14	14	13
Antal laboratorier med avvikande mätvärden	—	—	—	—	—	1 (*)
Antal godkända resultat	28	14	14	28	28	26
Antal resultat som visade närvaro av chalkoner	28	14	14	0	28	0
Antal resultat som visade frånvaro av chalkoner	0	0	0	28	0	26
Procentandel korrekta resultat (%)	100	100	100	100	100	100

▼**M1**

(*) Inkonsekventa resultat på grund av provtagningsfel för dubbelprov.

Prov	G	H	I	J	K
Antal laboratorier efter eliminering av sådana med avvikande mätvärden	14	14	14	14	14
Antal laboratorier med avvikande mätvärden	—	—	—	—	—
Antal godkända resultat	28	14	14	28	28
Antal resultat som visade närvaro av chalkoner	0	0	0	0	0
Antal resultat som visade frånvaro av chalkoner	28	14	14	28	28
Procentandel korrekta resultat (%)	100	100	100	100	100

Provtyper :

A Pastis, dubbelblindprov

B Pastis, ett prov

C Pastis, ett prov

D ”Pastis” (utan chalkoner), dubbelblindprov

E ”Pastis” (utan chalkoner), dubbelblindprov

F Likör smaksatt med anis (utan chalkoner), dubbelblindprov

G Likör smaksatt med anis (utan chalkoner), dubbelblindprov

H Ouzo (utan chalkoner), ett prov

I Ouzo (utan chalkoner), ett prov

J Anis (utan chalkoner), dubbelblindprov

K ”Pastis” (utan chalkoner), dubbelblindprov

▼M1

IX. **Äggula. Bestämning av koncentrationen av äggula i spritdrycker — fotometrisk metod**

1. **Tillämpningsområde**

Metoden används för att bestämma koncentrationen äggula i intervallet 40–250 g/l i ägglikör och likör med ägg.

2. **Referenser**

ISO 3696:1987 Vatten för analys – Krav och provningsmetoder

3. **Princip**

De etanollösliga fosforhaltiga ämnen som finns i äggula extraheras och bestäms fotometriskt i form av ett komplex av fosfor och molybdat.

4. **Reagens och material**

4.1. Dubbeldestillerat vatten

4.2. Kiselgur

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

4.4. 15-procentig lösning av magnesiumacetat (CAS 16674-78-5)

4.5. 10-procentig svavelsyra (CAS 7664-93-9)

4.6. 1 N svavelsyra

4.7. 0,16 g/l lösning av kaliumdivätefosfat (CAS 778-77-0), KH_2PO_4

4.8. Reagens för fosfatbestämning:

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

Lös i ett annat kärl 1 g ammoniumvanadat (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3, i 300 ml hett vatten, låt svalna och tillsätt sedan 140 ml koncentrerad salpetersyra (CAS 7697-37-2). Blanda de två avsvalnade lösningarna i en 1 000 ml mätkolv och späd till märket.

5. **Utrustning**

5.1. 100 ml E-kolv

5.2. Ultraljudsbad (eller magnetomrörare)

5.3. 100 ml mätkolv

5.4. 20 ºC vattenbad

5.5. Filter (Whatman nr 4 eller motsvarande)

5.6. Degel i porslin (eller platina)

5.7. Kokande vattenbad

5.8. Värmeplatta

5.9. Förbränningsugn (muffelugn)

5.10. 50 ml mätkolv

5.11. 20 ml mätkolv

5.12. Spektrofotometer inställd på 420 nm

5.13. 1 cm kyvett

6. **Prov**

Proven skall lagras vid rumstemperatur före analys.

7. **Utförande:**

7.1. Beredning av prov

7.1.1. Väg upp 10 g prov i en 100 ml E-kolv (5.1).

7.1.2. Tillsätt stegvis 70 ml etanol (4.3) i små portioner, rotera kolven mellan tillsatserna, och placera den sedan i ett ultraljudsbad (5.2) i

▼M1

femton minuter (eller rör om med magnetomrörare (5.2) i tio minuter vid rumstemperatur).

7.1.3. Överför kolvens innehåll till en 100 ml mätkolv (5.3) genom att skölja med etanol (4.3). Späd till märket med etanol (4.3) och placera mätkolven i ett 20 ºC vattenbad (5.4). Späd till märket vid 20 ºC.

7.1.4. Tillsätt en liten mängd kiselgur (4.2) och filtrera (5.5). Häll bort de första 20 ml.

7.1.5. Överför 25 ml av filtratet till en degel av porslin (eller platina) (5.6). Filtratet skall sedan koncentreras genom varsam avdunstning i ett kokande vattenbad (5.7), med tillsats av 5 ml 15-procentig magnesiumacetatlösning (4.4).

7.1.6. Placera degeln på en värmeplatta (5.8) och värm tills filtratet precis har torkat.

7.1.7. Förbränn filtratet till aska genom att hetta upp det till glödpunkten vid 600 ºC i en förbränningsugn (5.9) tills endast vit aska återstår. Förbränningen skall pågå minst 1,5 timmar, men över natt går också bra.

7.1.8. Lös askan i 10 ml 10-procentig svavelsyra (4.5) och överför lösningen till en 50 ml mätkolv (5.10) genom att skölja upprepade gånger med destillerat vatten (4.1). Späd till märket vid rumstemperatur med destillerat vatten (4.1). En 5 ml alikvot av denna lösning av askan skall användas för att bereda provlösningen för fotometribestämning.

7.2. Fotometrisk fosfatbestämning

7.2.1. Referenslösning

7.2.1.1. Häll 10 ml 10-procentig svavelsyra (4.5) i en 50 ml mätkolv (5.10) och späd till märket med destillerat vatten (4.1).

7.2.1.2. Tillsätt 1 ml 1 N svavelsyra (4.6) och 2 ml fosfatreagens (4.8) till en 5 ml alikvot av denna lösning (7.2.1.1), i en 20 ml mätkolv (5.11). Späd till märket med destillerat vatten (4.1).

7.2.1.3. Förslut med en löst sittande propp, skaka och hetta upp i kokande vattenbad (5.7) i tio minuter. Kyl sedan lösningen i 20 ºC vattenbad (5.4) i tjuga minuter.

7.2.1.4. Fyll en 1 cm kyvett (5.13) med denna referenslösning.

7.2.2. Provlösning

7.2.2.1. Tillsätt 1 ml 1 N svavelsyra (4.6) och 2 ml fosfatreagens (4.8) till en 5 ml alikvot av asklösningen (7.1.8) i en 20 ml mätkolv (5.11). Späd till märket med destillerat vatten (4.1).

7.2.2.2. Förslut med en löst sittande propp, skaka och hetta upp i kokande vattenbad (5.7) i tio minuter. Kyl sedan lösningen i 20 ºC vattenbad (5.4) i tjugo minuter.

7.2.2.3. Den gula lösning som erhålls skall genast analyseras spektrofotometriskt (5.12) i en 1 cm kyvett (5.13) vid 420 nm mot referenslösningen (7.2.1.4).

7.2.3. Kalibreringskurva

7.2.3.1. Gör lösningar till kalibreringen genom att tillsätta 2 ml alikvoter av fosfatreagenset (4.8) till 20 ml mätkolvar (5.11) som var och en innehåller 1 ml 1 N svavelsyra (4.6) och 0, 2, 4, 6, 8 respektive 10 ml kaliumdivätefosfatlösning (4.7). Späd till märket med destillerat vatten (4.1).

7.2.3.2. Förslut med en löst sittande propp, skaka och hetta upp i kokande vattenbad (5.7) i tio minuter. Kyl sedan lösningarna i 20 ºC vattenbad (5.4) i tjugo minuter. Analysera spektrofotometriskt (5.12) i en 1 cm kyvett (5.13) vid 420 nm mot referenslösningen (7.2.1.4).

7.2.3.3. Konstruera kalibreringskurvan

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

▼M1

8. **Redovisning av resultaten**

Koncentrationen av äggula uttryckt i g/l beräknas med följande formel:

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

där

110	är konverteringsfaktorn för total mängd av P_2O_5 i gram i 100 g äggula,
mg P_2O_5	är värdet som erhålls från kalibreringskurvan,
densitet	massa per volymsenhet (g/ml) av äggbaserad likör vid 20 ºC,
E	den äggbaserade likörens vikt i g,
40	spädningsfaktorn för en 5 ml alikvot av asklösning.

9. **Metodutvärdering (noggrannhet)**

Statistiska resultat från provningsjämförelsen:

Värdena för äggula anges i tabellen nedan.

Följande data erhölls från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden.

År då provningsjämförelsen gjordes	1998
Antal laboratorier	24
Antal prov	5
Analyt:	äggula

Prov	A	B	C	D	E
Antal laboratorier efter eliminering av sådana med avvikande mätvärden	19	20	22	20	22
Antal laboratorier med avvikande mätvärden	3	4	2	4	2
Antal godkända resultat	38	40	44	40	44
Medelvärde	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Relativ standardavvikelse, repeterbarhet (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Repeterbarhetsgräns (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Reproducerbarhetsgräns (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Provtyper:

A Advocaat, dubbelblindprov

B Advocaat, dubbelblindprov

C Advocaat, dubbelblindprov

▼**M1**

D Advocaat, (utspädd) ”split levels” (*)

E Advocaat, dubbelblindprov