

Den här texten är endast avsedd som ett dokumentationshjälpmedel och har ingen rättslig verkan. EU-institutionerna tar inget ansvar för innehållet. De autentiska versionerna av motsvarande rättsakter, inklusive ingresserna, publiceras i Europeiska unionens officiella tidning och finns i EUR-Lex. De officiella texterna är direkt tillgängliga via länkarna i det här dokumentet

► **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
► <u>M1</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 2091/2002 av den 26 november 2002	L 322	11	27.11.2002
► <u>M2</u>	Kommissionens genomförandeförordning (EU) 2016/635 av den 22 april 2016	L 108	1	23.4.2016
► <u>M3</u>	Kommissionens genomförandeförordning (EU) 2023/383 av den 16 februari 2023	L 53	3	21.2.2023

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

▼M3*Artikel 1a*

1. Denna förordning är tillämplig på jordbruksalkohol enligt definitionen i artikel 5 i Europaparlamentets och rådets förordning (EU) 2019/787 ⁽¹⁾.

2. Unionsreferensmetoderna för analys av jordbruksalkohol ska vara de som anges i bilagan till denna förordning.

3. Vid tillämpning av denna förordning ska jordbruksalkohol betraktas som ett destillat vars alkoholhalt i volymprocent ska mätas direkt i enlighet med bilaga II i kapitel I i bilagan.

Om alkoholprovet inte har klarnat eller om suspenderade partiklar är synliga ska dock provet destilleras.

4. För bestämning av flyktiga ämnen ska kalibrering med standardlösning C beredd i absolut etanol krävas för att uppnå lämplig matrismatchning mellan prover och standardlösningar så som anges i kapitel III.2 i bilagan.

⁽¹⁾ Europaparlamentets och rådets förordning (EU) 2019/787 av den 17 april 2019 om definition, beskrivning, presentation och märkning av spritdrycker, användning av namn på spritdrycker i presentationen och märkningen av andra livsmedel, skydd av geografiska beteckningar för spritdrycker, användning av jordbruksalkohol och destillat av jordbruksprodukter i alkoholhaltiga drycker samt om upphävande av förordning (EG) nr 110/2008 (EUT L 130, 17.5.2019, s. 1).

▼M3

5. För bestämning av furfural, så som anges i kapitel X i bilagan, ska jordbruksalkohol spädas två gånger med vatten så att den ursprungliga volymen fördubblas och når en alkoholhalt i volymprocent som överensstämmer med kalibreringslösningarna. Resultatet från analysen av furfural ska omvandlas till gram per hektoliter alkohol (100 volymprocent) enligt ekvationen "koncentration av furfural i gram per hektoliter 100 vol-% alkohol = koncentration av furfural i mg/l \times 10/alkoholhalt i volymprocent", där alkoholhalten i volymprocent (vol-%) är alkoholhalten hos det uppmätta provet så som fastställs i kapitel I i bilagan.

6. För bestämning av ^{14}C -halten i etanol ska den metod som anges i kapitel XI i bilagan användas.

▼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

- 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. 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 (gas-kromatografi)
 - III.3 Flyktig syra ► **M2** ————— ◀
 - IV. Vätecyanid p.m.
 - V. Anetol ► **M1** ————— ◀
 - VI. Glycyrrhizinsyra ► **M1** ————— ◀
 - VII. Chalkon ► **M1** ————— ◀
 - VIII. Total sockerhalt ► **M2** ————— ◀
 - IX. Äggula ► **M1** ————— ◀
- ▼ **M2**
- X. Bestämning av träföreningar: furfural, 5-hydroximetylfurfural, 5-metylfurfural syringaldehyd, coniferaldehyd, sinapinaldehyd, gallussyra, ellagsyra, vanillinsyra, syringinsyra och scopoletin
- ▼ **M3**
- XI. Bestämning av ¹⁴C-halten i etanol

▼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 °C.

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

3.2 Densitet:

En spritdrycks *densitet* definieras som massan per volymenhet i vakuum vid 20 °C. Den uttrycks i kg/m³ och betecknas $\rho_{20\text{ °C}}$ eller ρ_{20} .

3.3 Specifik vikt:

Med *specifik vikt* avses förhållandet, uttryckt som ett decimalbråk, mellan densiteten hos en spritdryck vid 20 °C och densiteten av vatten vid samma temperatur. Som beteckning används någon av symbolerna $d_{20\text{ °C}/20\text{ °C}}$, $d_{20/20}$, 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 °C:

$\rho_{20} = 998,203 \times d_{20/20}$ eller $d_{20/20} = \rho_{20}/998,203$ där 998,203 är vattens densitet vid 20 °C.

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 °C i förhållande till densiteten vid 20 °C 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).

▼B

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.

Omvandlingsformel:

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

där

ASM = alkoholhalten i massprocent,

$\rho_{20} (\text{alkohol}) = 789,24 \text{ kg/m}^3$

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**

Spritn 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 °C.

Vattenbad med termostat för temperaturen 20 °C ($\pm 0,2$ °C).

4.2 Mätkolvar av klass A, 100 och 200 ml, kalibrerade till en noggrannhet av $\pm 0,1$ % 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.

— Kyslinga, 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 provvolym 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.

▼B**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

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 °C).

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 torrs substans per liter räcker det med 60 ml sköljvatten. För att förhindra pyrolys skall i övriga fall åtminstone 70 ml sköljvatten användas om torrs substanshalten är 300 g/l, 85 ml vid 400 g/l och 100 ml vid 500 g/l (vissa fruktklikörer 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 °C 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 $\pm 0,5$ °C. 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.

▼B

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 °C 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 $\pm 0,5$ °C. 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 °C. 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 °C.
- Den vattenfyllda pyknometerns vikt vid 20 °C.

▼B

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 °C (P1).
- Tareringsflaskans vikt (T0).

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

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 °C 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:

$$m = 0,0012 \times (P1 - P)$$

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

- Pyknometerns volym vid 20 °C:

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

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

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

- Massan av vattnet i pyknometern vid 20 °C:

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

där 0,998203 är vattnets densitet vid 20 °C.

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.

▼B

- 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 °C 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 egenvekt = $p + m$

där m är massan av luften i pyknometern.

$$m = 0,0012 \times (p - p')$$

— Pyknometerns volym vid 20 °C:

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

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

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

— Massan av vattnet i pyknometern vid 20 °C:

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

där 0,998203 är vattnets densitet vid 20 °C.

- 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 °C 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 °C

$$= P2 - (P - m + dT)$$

— Densiteten vid t °C (g/ml)

$$\rho_{t\text{ °C}} = [P2 - (P - m + dT)] / V_{20\text{ °C}}$$

— Värdet för densiteten vid t °C omvandlas till kg/m^3 genom att $\rho_{t\text{ °C}}$ multipliceras med 1 000. Det erhållna värdet betecknas ρ_t .

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

▼B

Leta rätt på den horisontella rad i tabellen som motsvarar temperaturen T i hela grader och som befinner sig direkt under t °C, 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 $20 \pm 0,2$ °C 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 °C i förhållande till densiteten hos olika vatten/alkohol-blandningar vid 20 °C. 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 °C betecknas p'' .

A.4.2.2.2 Beräkning av resultat

- Massan av vätskan i pyknometern vid t °C.

$$= p + m - p''$$

- Densiteten vid t °C (g/ml)

$$\rho_{t^{\circ}\text{C}} = (p + m - p'')/V_{20^{\circ}\text{C}}$$

- Densiteten vid t °C skall uttryckas i kg/m^3 . Korrigera för temperaturen och räkna sedan fram alkoholhalten vid 20 °C 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 erhöles från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden [1] [2].

År då provningsjämförelsen gjordes	1997
Antal laboratorier	20
Antal prov	6

▼B

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 Frukttlikör, ”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 RESONANSFREKVENSS-OSCILLATION HOS ETT PROV I EN OSCILLERANDE MÅTCELL

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.

▼B

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

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 $\pm 0,02$ °C.

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 °C kan leda till densitetsförändringar i storleksordningen 0,1 kg/m³.

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 °C i förhållande till densiteten hos olika vatten/alkohol-blandningar vid 20 °C. 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 erhöles 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

▼B

Prov	A	B	C	D	E	F
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
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 Frukttlikör, ”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 (VOLYM-PROCENT) 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.

▼B

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

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.

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 °C, dock helst 20 °C.

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 °C, dock helst 20 °C.

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 °C (ρ_t).

C.4.4.3 Räkna om ρ_t till ρ_{20} med hjälp av densitetstabellen ρ_T 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.

▼B

C.4.5.2 Låt flottören ligga i vätskan i 1 tim. Roter 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 °C i förhållande till densiteten hos olika vatten/alkohol-blandningar vid 20 °C. 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

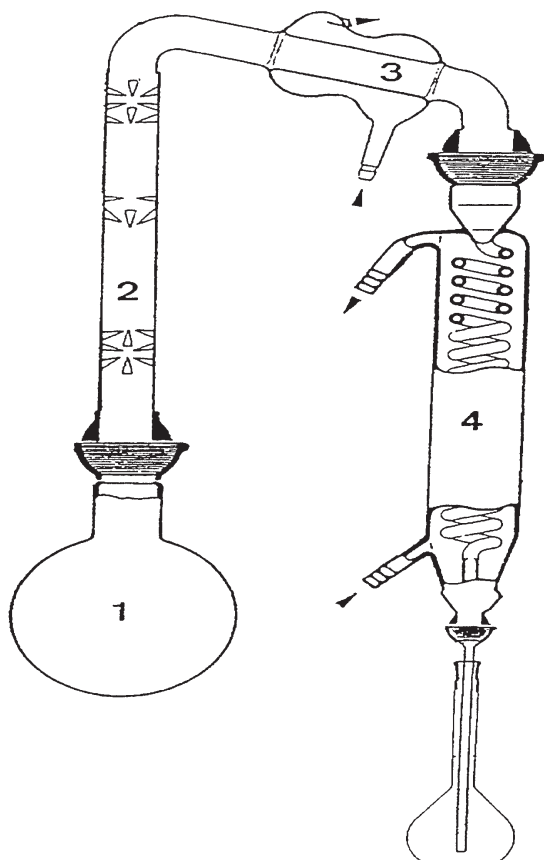
Följande data erhöles från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden [1] [2].

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
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

Provytyper:

- A Frukttlikör, ”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 $105\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. 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 erhöles 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

Provyter:

A Konjak, dubbel-blind-försök.

B Rom, "split level".

C Grappa, "split level".

D Akvavit, "split level".



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 GASKROMATOGRFISK 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.

▼B**3. Definition**

Kongener är flyktiga ämnen som bildas tillsammans med etanol vid spritdryckers jäsnings, 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 kvalitativa 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 °C. 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 mätkejsla på 1 l, fyll på med 600 ml destillerat vatten och blanda väl.

▼M3

- 5.13a Endast för jordbruksalkohol: absolut alkohol (CAS 64-17-5).

▼ B

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

Alla standardlösningar skall lagras vid $< 5^{\circ}\text{C}$ 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.

▼ M3

- 5.14.1a Endast för jordbruksalkohol: standardlösning A ska förberedas genom att pipettera reagensen med reducerade volymer av högre alkoholer för att få standardlösningar med koncentrationer som ligger nära de lagstadgade gränserna för jordbruksalkohol.

▼ 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.

▼ M3

- 5.14.2a Endast för jordbruksalkohol: standardlösning B ska förberedas genom att pipettera en lämplig inre standard med reducerade volymer för att få standardlösningar med koncentrationer som ligger nära de lagstadgade gränserna för jordbruksalkohol.

▼B

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 etanol-lösning (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.

▼ B**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 databehandlings-system 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)
Kolonntemperatur:	35 °C i 17 min. Öka därefter med 12 °C/min. till 70 °C. Bibehåll denna temperatur i 25 min.
Injektortemperatur:	150 °C
Detektortemperatur:	250 °C
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 °C i 10 min. Öka med 5 °C/min. till 110 °C. Öka därefter med 30 °C/min. till 190 °C. Bibehåll denna temperatur i 2 min.
Injektortemperatur:	260 °C
Detektortemperatur:	300 °C
Injektionsvolym:	1 µl, split 55:1

▼ B

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

Kolonntemperatur:	65 °C i 4 min. Öka med 10 °C/min. till 140 °C. Bibehåll denna temperatur i 5 min. Öka därefter med 5 °C/min. till 150 °C. Bibehåll denna temperatur i 3 min.
Injektortemperatur:	65 °C
Detektortemperatur:	200 °C
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 °C.

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.

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 °C.

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 tripelanalys 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

▼B

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.

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

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

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.

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

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:

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

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

▼B

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):

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

Analyternas koncentration i QC-standard 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:

$$4) \text{ Konc. (g/100 liter absolut alkohol)} = \text{Konc. (µg/g)} \times \rho \times 10 / (\text{alkoholhalt } <(\text{vol-\%}) \times 1\,000)$$

där

ρ = densiteten i kg/m³.

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 $\pm 10\%$ kan analysen fortsätta. Om detta inte är fallet bör orsaken till avvikelserna 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-metylbutan-1-ol, 3-metylbutan-1-ol.

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

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

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

▼B

Prov	A	B	C	D	E
Antal godkända resultat	56	52	54	54	56
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	15,1
				6,60 (*)	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

Provytyper:

- 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	32,7
				15,8 (*)	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

▼B

Prov	A	B	C	D	E
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) $\mu\text{g/g}$	13	15	24,1	7,3	9,0
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Reproducerbarhetsgräns (R) $\mu\text{g/g}$	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 provningsjämförelsen 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}) $\mu\text{g/g}$	319,8	2 245	1 326	83,0	18,6
				61,5 (*)	28,9 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (S_r) $\mu\text{g/g}$	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) $\mu\text{g/g}$	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Standardavvikelse, reproducerbarhet (S_R) $\mu\text{g/g}$	13	99	60	4,5	2,8
Relativ standardavvikelse, reproducerbarhet (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Reproducerbarhetsgräns (R) $\mu\text{g/g}$	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 provningsjämförelsen gjordes 1997

Antal laboratorier 32

Antal prov 4

Analyt butan-2-ol

▼B

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
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 provningsjämförelsen 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

▼B

Prov	A	B	C	D	E
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

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

▼B

Prov	A	B	C	D	E
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" (*).

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" (*).

▼ **B**

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 eliminerings 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	212,3
				120,4 (*)	245,6 (*)
Standardavvikelse, repeterbarhet (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
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" (*).

▼ **M2**

III.3. BESTÄMNING AV HALTEN AV FLYKTIGA SYROR I SPRITDRYCKER

1. Omfattning

Metoden har validerats i en provningsjämförelse för rom, brandy, sprit tillverkad av druvrester och fruktbrännvin, på nivåer från 30 mg/l till 641 mg/l.

2. Referenser

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

3. Definitioner

- 3.1 Halt av flyktiga syror beräknas genom att halten av icke flyktiga syror dras ifrån den totala syrahalten.
- 3.2 *total syrahalt*: summan av titrerbara syror (total syra).
- 3.3 *halt av icke flyktiga syror*: syrahalten i den rest som återstår efter indunstning av spritdrycken till torrhet.

4. Princip

Den totala syrahalten och halten icke flyktiga syror bestäms genom titrering eller potentiometrisk titrering.

5. Reagens och material

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

▼ **M2**

5.1 0,01 M natriumhydroxidlösning (NaOH)

5.2 Blandindikatorlösning:

Väg upp 0,1 g indigokarmin och 0,1 g fenolrött.

Lös i 40 ml vatten och fyll med etanol till 100 ml.

6. **Utrustning**

Indirekt laboratorieutrustning, laboratorieglass (klass A) och följande:

6.1 Vattenpump

6.2 Rotationsindunstare eller ultraljudsbad

6.3 Utrustning för potentiometrisk titrering (fakultativt)

7. **Insamling och förvaring av prov**

Proven förvaras vid rumstemperatur i väntan på analys.

8. **Utförande**

8.1 Total syrahalt

8.1.1 Beredning av provet

Spritdrycken behandlas med ultraljud (sonikering) eller omrörning i två minuter under vakuum för att avlägsna eventuell koldioxid.

8.1.2 Titrering

Pipettera över 25 ml av spritdrycken i en 500 ml Erlenmayerkolv.

Tillsätt ca 200 ml avsvalnat kokt destillerat vatten (nyberett samma dag) och 2–6 droppar av blandindikatorlösningen (5.2).

Titra med 0,01 M natriumhydroxidlösning (5.1) tills den gulgröna färgen slår om till violett för färglösa spritdrycker, alternativt den gulbruna färgen slår om till rödbrunt för brunfärgade spritdrycker.

Titreringen kan även utföras potentiometriskt till pH 7,5.

Den tillsatta volymen 0,01 M natriumhydroxidlösning betecknas n_1 ml.

8.1.3 Beräkning

Den totala syrehalten (TS) uttryckt i milliekvivalenter per liter spritdryck är lika med $0,4 \times n_1$.

Den totala syrehalten (TS') uttryckt i milligram ättiksyra per liter spritdryck är lika med $24 \times n_1$.

8.2 Halt av icke flyktiga syror

8.2.1 Beredning av provet

Indunsta 25 ml spritdryck till torrhet:

Pipettera över 25 ml spritdryck till en flatbottnad cylindrisk indunstnings-skål, 55 mm i diameter. Under indunstningsprocessens första timme placeras indunstningsskålen på locket till ett kokande vattenbad. Vätskan i skålen får inte koka, eftersom detta kan leda till förluster genom stänk.

Avsluta indunstningen genom att låta indunstningsskålen stå två timmar i torkugn vid 105 °C. Låt indunstningsskålen svalna i en exsickator.

8.2.2 Titrering

Lös den rest som återstår efter indunstning med avsvalnat kokt destillerat vatten (nyberett samma dag), späd till en volym på cirka 100 ml och tillsätt 2–6 droppar blandindikatorlösning (5.2).

▼ **M2**

Titra med 0,01 M natriumhydroxidlösning (5.1).

Titreringen kan även utföras potentiometriskt till pH 7,5.

Den tillsatta mängden 0,01 M natriumhydroxidlösning betecknas n_2 ml.

8.2.3 Beräkning

Den totala halten av icke flyktiga syror (TIFS) uttryckt i milliekvivalenter per liter spritdryck är lika med $0,4 \times n_2$.

Den totala halten av icke flyktiga syror (TIFS) uttryckt i milligram ättiksyra per liter spritdryck är lika med $24 \times n_2$.

9. **Beräkning av halten av flyktiga syror**

9.1 Uttryckt i milliekvivalenter per liter:

Följande benämningar gäller:

TS = total syrahalt i milliekvivalenter per liter

TIFS = total halt av icke flyktiga syror i milliekvivalenter per liter

Halt av flyktiga syror, FS i milliekvivalenter per liter är lika med:

$TS - TIFS$

9.2 Uttryckt i milligram ättiksyra per liter:

Följande benämningar gäller:

TS' = total syrahalt i milligram ättiksyra per liter

TIFS' = total halt av icke flyktiga syror i milligram ättiksyra per liter

Halt av flyktiga syror, FS i milligram ättiksyra per liter är lika med:

$TS' - TIFS'$

9.3 Uttryckt i gram ättiksyra per hl ren alkohol 100 volymprocent är lika med:

$$\frac{TS' - TIFS'}{A} \times 10$$

där A är spritdryckens alkoholhalt i volymprocent.

10. **Metodutvärdering (precision)**

10.1 Statistiska resultat från provningsjämförelsen

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

År då provningsjämförelsen gjordes 2000

Antal laboratorier 18

Antal prov 6

Prov	A	B	C	D	E	F
Antal kvarvarande laboratorier efter eliminering av avvikande mätvärden	16	18	18	14	18	18
Antal avvikande mätvärden (laboratorier)	2			4		
Antal godkända resultat	32	36	36	28	36	36
Medelvärde (\bar{x}) [mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5

▼ **M2**

Prov	A	B	C	D	E	F
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD _r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Standardavvikelse för reproducerbarhet s _R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD _R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Reproducerbarhetsgräns, R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Provtyper:

- A Plommonsprit, ”split level” *
- B Rom I, dubbelblindprov
- C Rom II, ”split level” *
- D Slivovitz, dubbelblindprov
- E Brandy, dubbelblindprov
- F Sprit av druvrester, dubbelblindprov

[1] ”Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies”, Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332–343.

[2] Horwitz, W. (1982) ”Analytical Chemistry 54, 67A-76A”.

▼ **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 extraktion 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 °C), skyddade från ljus, i aluminiumbehållare eller i färgade (bruna) reagensflaskor av glas. Proparna bör helst förseglas med aluminium. Trans-anetolen måste "tinas" från kristallform före användning, men temperaturen får då aldrig överstiga 35 °C.

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 °C), 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.

▼ M1**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 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:

▼ M1

- 6.1. Bärigas: analytiskt ren helium
- 6.2. Flödes hastighet: 2 ml/min
- 6.3. Injektortemperatur: 250 °C
- 6.4. Detektortemperatur: 250 °C
- 6.5. Data för ugnstemperatur: isotermisk, 180 °C, 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.

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.

$R = \text{topphöjden eller topparean för trans-anetol dividerat med topphöjden respektive topparean för estragol.}$

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.

▼ M1**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:

$$RF_i = (C_i / \text{area eller höjd}_i) * (\text{area eller höjd}_{is} / C_{is})$$

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:

$$c_i = C_{is} * (\text{area eller höjd}_i / \text{area eller höjd}_{is}) * RF_i$$

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 ($CV \% = (\text{standardavvikelse/medelvärde}) * 100$) ligger inom $\pm 1\%$ är genomsnittsvärdet för RF_i godtagbart.

▼ **M1**

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 $\pm 2,5\%$ 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 ($T < 5\text{ °C}$) i minst två timmar.

▼ M1

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, håller 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.

12.5. Bestämning

Följ anvisningarna i 8.5.

12.6. Resultatberäkning

Använd följande formel för att beräkna resultaten:

$$C_i = (m_{is}/V) * (area_i/area_{is}) * RF_i$$

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 erhöles från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden.

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

▼ **M1**

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

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, reproducerbarhet (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 20°C:

— 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).

▼ M1

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).

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. Laborieutrustning

- 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):

— Flödes hastighet 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).

▼ **M1**

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:

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

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 erhöles 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

▼ M1

Prov	A	B	C	D	F
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, CH₃CN, (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, CH₃COONa, (CAS 127-09-3)

4.5. Isättika, CH₃COOH, (CAS 64-19-7)

4.6. Beredning av lösningar

4.6.1. Etanol, 50 % (vol.)

För att bereda 1 000 ml vid 20 °C:

— 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.

▼ M1

- 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.
- 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 $40 \pm 0,1$ °C.
 - 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 laborietrustning, bland annat:
 - 6.4.1. Analysvåg (noggrannhet: $\pm 0,1$ 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.

▼ **M1**

- Stabilisering av kolonnen mellan injektioner:
- Samma koncentration, 20/80 (v/v), i fem minuter.

6.5.2. Flödes hastighet: 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).

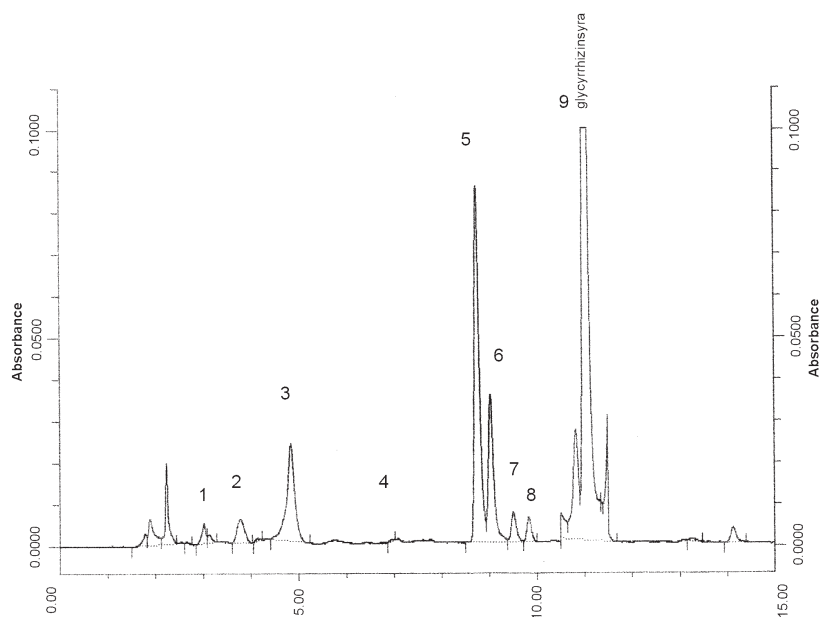
7.3.2. Injicera 20 µl av provet (7.1) (prov av spritdryck smaksatt med anis). Gör analysen under de kromatografibetingelser som beskrivs ovan (6.5).

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.



▼ **M1**9. **Metodutvärdering (noggrannhet)**

Resultat från provningsjämförelsen:

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

Följande data erhöles 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

(*) 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

▼ M1

- 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

▼ **M2****VIII. TOTAL SOCKERHALT****1. Omfattning**

HPLC-RI-metoden tillämpas för bestämning av den totala sockerhalten (uttryckt som invertsocker) i spritdrycker, med undantag av likör innehållande ägg och mjölkprodukter.

Metoden har validerats i en provningsjämförelse för pastis, destillerad anis, körsbärslikör, crème de (följt av namnet på en frukt eller den råvara som använts) och crème de cassis, på nivåer från 10,86 g/l till 509,7 g/l. Instrumentets mätresultat kunde visas vara linjära i koncentrationsintervallet 2,5–20,0 g/l.

Denna metod är inte avsedd för bestämning av låga halter av socker.

2. Referenser

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

3. Princip

Analys av sockerlösningar med hjälp av vätskekromatografi (HPLC) i syfte att bestämma koncentrationen av glukos, fruktos, sackaros, maltos och laktos.

Denna metod använder alkylamin som stationär fas och refraktionsindexdetektor, och anges som exempel. Användning av anjonbytarhartser som stationär fas är också möjligt.

4. Reagens och material

4.1 Glukos (CAS 50-99-7) med en renhet på minst 99 %.

4.2 Fruktos (CAS 57-48-7) med en renhet på minst 99 %.

4.3 Sackaros (CAS 57-50-1) med en renhet på minst 99 %.

4.4 Laktos (CAS 5965-66-2) med en renhet på minst 99 %.

4.5 Maltosmonohydrat (CAS 6363-53-7) med en renhet på minst 99 %.

4.6 Ren acetonitril (CAS 75-05-8) för HPLC-analys.

4.7 Destillerat eller avmineraliserat vatten, helst mikrofiltrerat.

4.8 Lösningsmedel (exempel)

Elueringslösningen består av:

75 volymdelar acetonitril (4.6)

25 volymdelar destillerat vatten (4.7)

Avlägsna gaser genom att låta helium passera igenom långsamt under 5–10 minuter före användning.

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

4.9 Absolut etanol (CAS 64-17-5).

4.10 Etanollösning (5 volymprocent).

4.11 Beredning av stamlösning (20 g/l)

Väg upp 2 g av varje sockerart som ska analyseras (4.1–4.5), och för över utan förlust till en 100 ml mätkolv. (Anm.: 2,11 g maltosmonohydrat motsvarar 2 g maltos).

▼ M2

Justera upp till 100 ml med 5 volymprocent alkohollösning (4.10), skaka och förvara vid cirka + 4 °C. Bered en ny stamlösning en gång i veckan.

4.12 Beredning av arbetslösningar (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 och 20,0 g/l)

Späd stamlösningen, 20 g/l, (4.11) med 5 volymprocent alkohollösning (4.10) så att det räcker till fem arbetslösningar på 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 och 20,0 g/l. Filtrera med ett filter med en porstorlek på högst 0,45 µm (5.3.)

5. **Utrustning**

5.1 HPLC-system med en upplösning som ger baslinjeseperation för alla sockerarter.

5.1.1 HPLC-kromatograf med en sexvägsventil för injektion försedd med en 10 µl rörslinga eller annan anordning, automatisk eller manuell, för tillförlitlig injektion av mikrovolymer.

5.1.2 Pumpsystem som gör det möjligt att upprätthålla ett konstant eller programmerat flöde med stor noggrannhet.

5.1.3 Differentialrefraktometer.

5.1.4 Integrator eller skrivare med prestanda som är kompatibla med resten av systemet.

5.1.5 Förkolonn:

Det rekommenderas att en lämplig förkolonn anbringas på analyskolonnen.

5.1.6 Kolonn (exempel):

Material:	rostfritt stål eller glas.
Invändig diameter:	2–5 mm.
Längd:	100–250 mm (beroende på de packade partiklarnas storlek), till exempel 250 mm om partiklarna är 5 µm i diameter.
Stationär fas:	Alkylamin som funktionella grupper bundna till kiselgel, maximal partikelstorlek: 5 µm.

5.1.7 Kromatografibetingelser (exempel):

Elueringslösning (4.8), flödes hastighet: 1 ml/minut.

Detektion: Differentialrefraktometri.

För att det ska vara säkert att detektorn är helt stabil bör den slås på några timmar före användning. Referenskyvetten måste vara helt fylld med elueringslösningen.

5.2 Analysvåg med en noggrannhet av 0,1 mg.

5.3 Filtreringsanordning för små volymer med ett 0,45 µm mikromembran.

6. **Lagring av prover**

Efter mottagandet förvaras proven vid rumstemperatur i väntan på analys.

7. **Utförande**

7.1 DEL A: Provberedning

7.1.1 Skaka provet.

▼ **M2**

7.1.2 Filtrera provet med ett filter med en porstorlek på högst 0,45 µm (5.3.).

7.2 DEL B: HPLC

7.2.1 Bestämning

Injicera 10 µl av standardlösningarna (4.12) och proven (7.1.2). Utför analysen under lämpliga betingelser för kromatografi, t.ex. de betingelser som beskrivs ovan.

7.2.2 Om ett prov har en topp med större area (eller höjd) än motsvarande topp i den mest koncentrerade standardlösningen bör provet spädas med destillerat vatten och analyseras på nytt.

8. Beräkning

Jämför de två kromatogram som erhålls för standardlösningen och spritdrycken. Identifiera topparna med hjälp av deras retentionstider. Mät deras area (eller höjd) för beräkning av koncentrationerna enligt metoden för extern standard. Ta hänsyn till eventuella utspädningar av provet.

Slutresultatet är summan av sackaros, maltos, laktos, glukos och fruktos, uttryckt som invertsocker i g/l.

Invertsocker beräknas som summan av alla monosackarider och reduce-rande disackarider i provet, utöver den stökiometriskta mängden glukos och fruktos beräknad utifrån mängden sackaros i provet.

$$\text{Invertsocker (g/l)} = \text{glukos (g/l)} + \text{fruktos (g/l)} + \text{maltos (g/l)} + \text{laktos (g/l)} + (\text{sackaros (g/l)} \times 1,05)$$

$$1,05 = (\text{molekylvikten för fruktos} + \text{molekylvikten för glukos}) / \text{molekylvikten för sackaros}$$

9. Metodutvärdering (precision)

9.1 Statistiska resultat från provningsjämförelsen

Följande data erhöles från en internationell metodutvärderingsstudie utförd enligt internationellt vedertagna förfaranden [1] [2].

År då provningsjämförelsen gjordes	2000
Antal laboratorier	24
Antal prov	8

[1] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies", Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332-343.

[2] Horwitz, W. (1982) "Analytical Chemistry 54, 67A-76A".

Tabell 1

Fruktos, glukos, maltos

Analyt	Fruktos		Glukos			Maltos	
	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Aniskryddad spritdryck	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Aniskryddad spritdryck	Standard (10 g/l)
Prov (× 2)							
Medelvärde [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Antal laboratorier utan avvikande mätvärden	21	22	21	23	19	21	22

▼ M2

Analyt	Fruktos		Glukos			Maltos	
Prov (× 2)	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Aniskryddad spritdryck	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Aniskryddad spritdryck	Standard (10 g/l)
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r , [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Repeterbarhetsgräns, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabell 2

Sackaros

Analyt	Sackaros					
Prov	Pastis	Ouzo	Körsbärslikör	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (100 g/l)
Medelvärde [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Antal laboratorier utan avvikande mätvärden	19	19	20	18	18	18
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Repeterbarhetsgräns, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) "split level"

▼ **M2**

Tabell 3

Total sockerhalt

(Anm.: Dessa uppgifter beräknades för total sockerhalt, inte invertsocker enligt definitionen i punkt 8.)

Prov	Pastis	Ouzo	Aniskryddad spritdryck	Körsbärslikör	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (220 g/l)
Medelvärde [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Antal laboratorier utan avvikande mätvärden	20	19	20	20	18	18	19
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Repeterbarhetsgräns, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) "split level"

▼ **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), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, i 400 ml vatten vid 50 °C.

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 °C 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**

▼ M1**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 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 °C vattenbad (5.4). Späd till märket vid 20 °C.

7.1.4. Tillsätt en liten mängd kiselgur (4.2) och filtrera (5.5). Håll 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 °C 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 °C 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).

▼ M1

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 °C 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 °C 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 ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. Redovisning av resultaten

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

$$\text{g/l äggula} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{densitet}}{E/40}$$

där

110 är konverteringsfaktorn för total mängd av P₂O₅ i gram i 100 g äggula,

mg P₂O₅ är värdet som erhålls från kalibreringskurvan,

densitet massa per volymenhet (g/ml) av äggbaserad likör vid 20 °C,

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 erhöles från en internationell metodstudie som utfördes enligt internationellt vedertagna förfaranden.

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

▼ **M1**

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
- D Advocaat, (utspädd) ”split levels” (*)
- E Advocaat, dubbelblindprov

▼ **M2****X. BESTÄMNING AV FÖLJANDE TRÄFÖRENINGAR I SPRITDRYCKER GENOM VÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC): FURFURAL, 5-HYDROXIMETYLFURFURAL, 5-METYLFURFURAL, VANILLIN, SYRINGALDEHYD, CONIFERALDEHYD, SINAPINALDEHYD, GALLUSSYRA, ELLAGSYRA, VANILLINSYRA, SYRINGINSYRA OCH SCOPOLETIN****1. Omfattning**

Metoden avser HPLC-bestämning av furfural, 5-hydroximetylfurfural, 5-metylfurfural, vanillin, syringaldehyd, coniferaldehyd, sinapinaldehyd, gallussyra, ellagsyra, vanillinsyra, syringinsyra och scopoletin.

2. Referenser

Analysmetod som godkänts av Internationella vinorganisationens (OIV) generalförsamling och offentliggjorts av OIV under referensnumret *OIV-MA-BS-16: R2009*.

3. Princip

Bestämning genom vätskekromatografi (HPLC), med detektion genom spektrofotometri med ultraviolett strålning vid flera våglängder och spektrofotometri.

4. Reagens

Reagensen måste vara av analytisk kvalitet. Vattnet ska vara destillerat vatten eller vatten med minst motsvarande renhetsgrad. Det är bäst att använda mikrofiltrerat vatten med resistivitet 18,2M Ω .cm

4.1 96 volymprocent alkohol.

4.2 Metanol med HPLC-kvalitet (lösningsmedel B).

4.3 Ättiksyra, utspädd till 0,5 volymprocent (lösningsmedel A).

4.4 Mobila faser: (anges endast som exempel).

Lösningsmedel A (0,5 % ättiksyra) och lösningsmedel B (ren metanol). Filtrera genom ett membran (porstorlek 0,45 μ m). Avlufta i ultraljudsbad, vid behov.

4.5 Referensstandarder med minst 99 % renhetsgrad: furfural, 5-hydroximetylfurfural, 5-metylfurfural, vanillin, syringaldehyd, coniferaldehyd, sinapinaldehyd, gallussyra, ellagsyra, vanillinsyra, syringinsyra och scopoletin

4.6 Referenslösning: standardsubstanserna är lösta i en 50 volymprocent vatten/alkohollösning. De slutliga koncentrationerna i referenslösningen bör vara följande:

furfural: 5 mg/l; 5-hydroximetylfurfural: 10 mg/l; 5-metylfurfural: 2 mg/l; vanillin: 5 mg/l; syringaldehyd: 10 mg/l; coniferaldehyd: 5 mg/l; sinapinaldehyd: 5 mg/l; gallussyra: 10 mg/l; ellagsyra: 10 mg/l; vanillinsyra: 5 mg/l; syringinsyra: 5 mg/l; scopoletin: 0,5 mg/l.

5. Utrustning

Vanlig laboratorierutrustning

5.1 Ett HPLC-system som kan fungera med binära gradienter och utrustat med:

5.1.1 En spektrofotometrisk detektor som kan mäta vid våglängder i intervallet 260–340 nm. Det är dock bäst att arbeta med en detektor för flera våglängder med en diodmatris eller liknande, i syfte att bekräfta topparnas renhet.

▼ **M2**

5.1.2 En spektrofluorometrisk detektor – excitationsvåglängd: 354 nm, emissionsvåglängd: 446 nm (för spårbestämning av scopoletin; som även är påvisbar genom spektrofotometri, vid 313 nm).

5.1.3 En injektor som kan föra in 10 eller 20 µl (exempelvis) av provet.

5.1.4 En HPLC-kolonn av typen RP C18, maximal partikelstorlek 5 µm.

5.2 Injektionssprutor för HPLC.

5.3 Anordning för membranfiltrering av små volymer.

5.4 Integrator eller skrivare med prestanda som är kompatibla med hela utrustningen, och som i synnerhet måste ha flera kanaler för registrering av data.

6. Utförande

6.1 Beredning av den lösning som ska injiceras

Referenslösningen och spritdrycken filtreras vid behov genom ett membran med en pordiameter på högst 0,45 µm.

6.2 Kromatografibetingelser: utför analysen vid rumstemperatur med den utrustning som beskrivs i 5.1 där de mobila faserna (4.4) används vid ett flöde på ungefär 0,6 ml/min enligt gradienten nedan (anges endast som exempel):

Tid: 0 min 50 min 70 min 90 min

Lösningsmedel A (vatten-syra): 100 % 60 % 100 % 100 %

Lösningsmedel B: metanol. 0 % 40 % 0 % 0 %

Observera att i vissa fall bör denna gradient ändras för att undvika samtidiga elueringar.

6.3 Bestämning

6.3.1 Injicera referensstandarderna separat, sedan blandade.

Anpassa driftsförhållandena så att lösningsfaktorerna för topparna är minst 1 för samtliga föreningar.

6.3.2 Injicera provet som beretts enligt 6.1.

6.3.3 Mät areorna för topparna i referenslösningen och spritdrycken och beräkna koncentrationerna.

7. Redovisning av resultaten

Uttryck koncentrationen för varje beståndsdel i mg/l.

8. Metodutvärdering (precision)

Följande data erhöles under 2009 från en internationell metodutvärderingsstudie för flera olika spritdrycker, genomförd enligt följande internationellt överenskomna förfaranden [1], [2].

8.1 Furfural

Analyt	Furfural					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	15	15	15	15	15	15
Antal godkända resultat (laboratorier)	14	12	13	14	13	13

▼ M2

Analyt	Furfural					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Medelvärde [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	8	15	5	13	3	5
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2 5-hydroximetylfurfural

Analyt	5-hydroximetylfurfural					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	16	16	16	16	16	16
Antal godkända resultat (laboratorier)	14	14	14	14	14	14
Medelvärde [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3 5-metylfurfural

Analyt	5-metylfurfural					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	11	11	11	11	11	11
Antal godkända resultat (laboratorier)	11	11	8	11	10	11

▼ M2

Analyt	5-metylfurfural					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Medelvärde [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4 Vanillin

Analyt	Vanillin					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	16	15	16	16	16	16
Antal godkända resultat (laboratorier)	16	15	16	16	16	16
Medelvärde [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5 Syringaldehyd

Analyt	Syringaldehyd					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	16	15	16	16	16	16
Antal godkända resultat (laboratorier)	13	13	13	12	14	13

▼ M2

Analyt	Syringaldehyd					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Medelvärde [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6 Coniferaldehyd

Analyt	Coniferaldehyd					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	13	12	13	12	13	13
Antal godkända resultat (laboratorier)	12	12	13	12	13	13
Medelvärde [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7 Sinapinaldehyd

Analyt	Sinapinaldehyd					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	14	14	14	14	15	14
Antal godkända resultat (laboratorier)	14	13	12	13	13	12

▼ M2

Analyt	Sinapinaldehyd					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Medelvärde [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8 Gallussyra

Analyt	Gallussyra					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	16	15	16	16	16	16
Antal godkända resultat (laboratorier)	15	14	16	16	16	16
Medelvärde [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9 Ellagsyra

Analyt	Ellagsyra					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	7	7	7	7	7	7
Antal godkända resultat (laboratorier)	7	7	7	7	7	6

▼ M2

Analyt	Ellagsyra					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Medelvärde [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10 Vanillinsyra

Analyt	Vanillinsyra					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	15	15	15	15	15	15
Antal godkända resultat (laboratorier)	12	11	14	14	15	14
Medelvärde [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11 Syringinsyra

Analyt	Syringinsyra					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	16	15	16	16	16	16
Antal godkända resultat (laboratorier)	16	15	15	15	16	15

▼ M2

Analyt	Syringsinsyra					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Medelvärde [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12 Scopoletin

Analyt	Scopoletin					
Prov	Whisky	Brandy	Rom	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Antal deltagande laboratorier	10	10	10	10	10	10
Antal godkända resultat (laboratorier)	9	8	9	8	8	8
Medelvärde [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Standardavvikelse för repeterbarhet, s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Relativ standardavvikelse för repeterbarhet, RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Repeterbarhetsgräns, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Standardavvikelse för reproducerbarhet, s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Relativ standardavvikelse för reproducerbarhet, RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Reproducerbarhetsgräns, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06

[1] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies", Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332–343.

[2] Horwitz, W. (1982) "Analytical Chemistry 54, 67A-76A".

▼ **M3****XI. BESTÄMNING AV ^{14}C -HALTEN I ETANOL****1. Inledning**

Bestämning av ^{14}C -halten i etanol gör det möjligt att skilja mellan alkohol av fossila råmaterial (s.k. syntetisk alkohol) och alkohol från nyligen erhållna råmaterial (s.k. jäsningsalkohol).

2. Definition

^{14}C -halten i etanol ska anses vara den ^{14}C -halt som bestäms med metoden som beskrivs här eller den metod som beskrivs i standarden EN 16640, metod C.

Den naturliga ^{14}C -halt i atmosfären (referensvärdet) som upptas av levande växter vid assimilation är inte något konstant värde. Därför bestäms referensvärdet av etanol som härrör från råmaterial från den senaste växtperioden. Detta årliga referensvärde bestäms varje år i enlighet med standarden EN 16640. Ett annat referensvärde kan dock godtas om det godkänns av ett ackrediterat organ.

3. Princip

^{14}C -halten bestäms direkt med hjälp av en vätskescintillometer i alkoholhaltiga prover med minst 85 viktprocent etanol.

4. Reagens**4.1 Toluenscintillator**

5,0 g 2,5-difenyloxazol (PPO).

0,5 g p-bis-[4-metyl-5-fenyloxazolyl(2)]-bensol (dimetyl-POPOP) i 1 l analytiskt ren toluen.

Bruksklara toluenscintillatorer med denna sammansättning som finns i handeln får också användas.

4.2 ^{14}C -standard

n-Hexadekan ^{14}C med en aktivitet på ca 1×10^6 dpm/g (ca $1,67 \times 10^6$ cBq/g) och en garanterad tillförlitlighet vad gäller den bestämda aktiviteten på ± 2 % rel.

4.3 ^{14}C -fri etanol

Syntetisk alkohol av fossila råmaterial med minst 85 viktprocent etanol för bestämning av bakgrundsvärdet.

4.4 Alkohol från nyligen erhållna råmaterial från den senaste växtperioden med minst 85 viktprocent etanol som referensmaterial.**5. Utrustning****5.1 Flerkanaliga vätskescintillationspektrometrar med processorer och automatisk extern standardisering samt indikatorer för förhållandet extern standard/kanal (normalutförande: tre mätkanaler och två kanaler för extern standard).****5.2 Kaliumfattiga räknerör som passar till spektrometrarna, med mörka skruvlock med polyeteninlägg.****5.3 Pipetter, 10 ml.****5.4 Automatisk doseringsanordning, 10 ml.****5.5 250 ml rundkolv med inslipad glaspropp.****5.6 Apparatur till destillering av alkohol med värmemantel, t.ex. Micko.****5.7 Mikroliterspruta, 50 µl.**

▼ M3

5.8 Pyknometertratt, pyknometrar, 25 ml och 50 ml. Alternativt bör likvärdig utrustning, såsom elektroniska densitetsmätare, tillåtas.

5.9 Termostat med en temperaturstabilitet på $\pm 0,01$ °C.

6. Utförande**6.1 Inställning av utrustningen**

Utrustningen ska ställas in i enlighet med tillverkarens instruktioner. Mätförhållandena är optimala när värdet E_2/B – kvalitetsindexet – är maximalt.

E = Efficiency (verkningsgrad)

B = Bakgrundsvärde

Endast två mätkanaler optimeras. Den tredje mätkanalen lämnas helt öppen för kontrolländamål.

6.2 Urval av räknerör

Ett större antal räknerör än vad som kommer att behövas fylls med 10 ml ^{14}C -fri syntetisk etanol och 10 ml toluenscintillator. Varje rör mäts under minst 4 cykler \times 100 minuter. Rör med bakgrundsvärden som avviker med mer än ± 1 % rel. från medelvärdet kasseras. Endast fabriksnya räknerör från samma produktionsserie får användas för samma urval.

6.3 Bestämning av förhållandet extern standard/kanal (ESKF)

Vid kanalinställningen (punkt 6.1) bestäms ESKF med hjälp av det relevanta datorprogrammet samtidigt med kontrollen av verkningsgraden. Som extern standard används cesium-137, som redan har byggts in av tillverkaren.

6.4 Beredning av prover

Prover med en etanolhalt av minst 85 viktprocent och fria från orenheter som absorberar vid lägre våglängder än 450 nm kan mätas. Den låga resthalten av aldehyder och estrar har ingen skadlig effekt. Provets alkoholhalt bestäms i ett tidigare skede med en noggrannhet på 0,1 %.

7. Mätning av proven med extern standard

7.1 Prover med ringa absorbans enligt punkt 6.4, med ett ESKF-värde på ca 1,8, kan mätas genom ESKF, som ger ett mått på verkningsgraden.

7.2 Mätning

10 ml av de prov som har beretts enligt punkt 6.4 pipetteras i ett utvalt räknerör, vars bakgrundsvärde har kontrollerats, och 10 ml toluenscintillator tillsätts med hjälp av en automatisk doseringsanordning. Proven i rören homogeniseras med lämpliga roterande rörelser; Vätskan får inte fukta polyeteninlägget i skruvlocket. På samma sätt bereds ett rör med ^{14}C -fri fossil etanol för bestämning av bakgrundsvärdet. För kontroll av ^{14}C -årsvärdet bereds ett dubbelprov av etanol från nyligen erhållna råmaterial från den senaste växtperioden genom att ett rör blandas med en inre standard enligt punkt 8.

Kontroll- och bakgrundsproven placeras först i mätningsserien, som inte får omfatta mer än tio analysprover. Den samlade mättiden per prov är minst 2×100 minuter, varvid mätningen av varje prov utförs i faser på 100 minuter var för att göra det möjligt att fastslå eventuell avdrift hos utrustningen eller annat fel. (En cykel omfattar således ett mätintervall på 100 minuter per prov.)

Bakgrunds- och kontrollprover ska förnyas efter fyra veckor.

▼ **M3**

När det gäller prover med ringa absorbans (ESKF-värde ca 1,8) påverkas verkningsgraden endast obetydligt av en ändring i detta värde. Om ändringen ligger inom $\pm 5\%$ rel. kan samma verkningsgrad förväntas. Vad gäller prover med större absorbans, t.ex. denaturerad alkohol, kan verkningsgraden fastställas med hjälp av korrektionskurvan för absorbans. I avsaknad av ett lämpligt datorprogram ska mätningen utföras med den inre standarden, som ger en otvetydig bestämning av verkningsgraden.

8. Mätning av proven med den inre standarden hexadekan¹⁴C

8.1 Utförande

Kontroll- och bakgrundsprover (fossil etanol och etanol från nyligen erhållna råmaterial) och det okända materialet mäts som dubbelprov. Det ena av dubbelproven bereds i ett icke utvalt rör, som tillsätts en noggrant doserad mängd (30 µl) hexadekan¹⁴C som inre standard (tillsatt aktivitet ca 26 269 dpm/g C, ca 43 782 cBq/g C). Provberedningen och mättiden för övriga prover fastställs i punkt 7.2, dock kan mättiden för proven med inre standard begränsas till ca fem minuter genom förinställning på 10^5 pulser. Ett dubbelprov av kontroll- och bakgrundsproven bereds för varje mätserie och dessa placeras först i mätserien.

8.2 Hantering av den inre standarden och räknerören

För att undvika föroreningar vid mätning med inre standard ska lagring och hantering äga rum i lokaler som är noggrant skilda från de lokaler där beredning och mätning av analysproven äger rum. Efter mätning kan de bakgrundskontrollerade rören återanvändas. Skruvlocken och rören innehållande inre standard ska kastas.

9. Redovisning av resultaten

9.1 Aktiviteten i ett radioaktivt ämne uttrycks i becquerel, där 1 Bq = 1 sönderfall/sek.

Den specifika radioaktiviteten anges i becquerel för 1 g kol = Bq/g C.

För att uppnå mera realistiska värden ska dessa anges i centibecquerel = cBq/g C.

De beteckningar och beräkningsformler som hittills har använts i litteraturen, och som bygger på dpm, kan också användas. För att erhålla motsvarande värden i cBq ska man multiplicera det uppnådda dpm-resultatet med 100/60.

9.2 Redovisning av resultaten med extern standard:

$$\text{cBq/g C} = \frac{(\text{cpm}_{\text{pr}} - \text{cpm}_{\text{NE}}) \cdot 1,918 \cdot 100}{V \cdot F \cdot Z \cdot 60}$$

9.3 Redovisning av resultaten med inre standard:

$$\text{cBq/g C} = \frac{(\text{cpm}_{\text{pr}} - \text{cpm}_{\text{NE}}) \cdot \text{dpm}_{\text{IS}} \cdot 1,918 \cdot 100}{(\text{cpm}_{\text{IS}} - \text{cpm}_{\text{pr}}) \cdot V \cdot F \cdot 60}$$

9.4 Förkortningar

cpm_{pr} = det genomsnittliga pulstalet för provet under hela mätnings-tiden.

▼ **M3**

cpmNE = det genomsnittliga pulstalet för bakgrundsvärdet beräknat på samma sätt.

cpmIS = pulstalet för prover med tillsatt inre standard.

dpmIS = mängden tillsatt inre standard (kalibrerad radioaktivitet dpm).

V = provvolymen i ml.

F = den halt i g av ren alkohol per ml som motsvarar koncentrationen.

Z = den verkningsgrad som motsvarar ESKF-värdet.

1,918 = g alkohol/g kol.

10. Metodens pålitlighet

10.1 Repeterbarhet (r)

$$r = 0,632 \text{ cBq/g C } S_{(r)} = \pm 0,223 \text{ cBq/g C}$$

10.2 Reproducerbarhet (R)

$$R = 0,821 \text{ cBq/g C } S_{(R)} = \pm 0,290 \text{ cBq/g C.}$$