

KOMISSIO ASETUS (EY) N:o 2091/2002,
annettu 26 päivänä marraskuuta 2002,
tislattujen alkoholijuomien analysoinnissa sovellettavista yhteisön vertailumenetelmistä annetun
asetuksen (EY) N:o 2870/2000 muuttamisesta

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

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

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Tislattujen alkoholijuomien analysoinnissa sovellettavista yhteisön vertailumenetelmistä 19 päivänä joulukuuta 2000 annetun komission asetuksen (EY) N:o 2870/2000 ⁽²⁾ liitteessä kuvataan nämä menetelmät.
- (2) Komission tukemissa tutkimuksissa on validoitu kansainvälisesti tunnustettujen periaatteiden mukaisesti neljä analyysimenetelmää: anetolin määrittäminen aniksellalla maustetuista tislatuista alkoholijuomista, glysyrritsiinihapon ja kalkonien määrittäminen pastiksesta sekä munankeltuaisen määrittäminen munalikööristä ja munaa sisältävästä likööristä.

(3) Nämä neljä menetelmää voidaan tunnustaa yhteisön vertailumenetelmiksi ja ne on lisättävä asetuksen (EY) N:o 2870/2000 liitteeseen.

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

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 2870/2000 liite seuraavasti:

- 1) Poistetaan liitteen sisällysluettelon V, VI, VII ja IX luvusta ilmaisu ”menetelmä julkaistaan myöhemmin”.
- 2) Lisätään tämän asetuksen liitteessä oleva V, VI, VII ja IX luku III luvun jälkeen.

2 artikla

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

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

Tehty Brysselissä 26 päivänä marraskuuta 2002.

Komission puolesta

Franz FISCHLER

Komission jäsen

⁽¹⁾ EYVL L 160, 12.6.1989, s. 1.

⁽²⁾ EYVL L 333, 29.12.2000, s. 20.

LIITE

V ANETOLI. TISLATTUJEN ALKOHOLIJUOMIEN TRANS-ANETOLIN KAASUKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS

1 Soveltamisala

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

2 Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin

ISO 3696: 1987 Analyttiseen laboratorikäyttöön tarkoitettu vesi — Määritelmä ja testimenetelmät

3 Periaate

Tislatus alkoholijuoman trans-anetolikonsentraatio määritetään kaasukromatografisesti. Testattavaan näytteeseen ja konsentraatioiltaan tunnettuun vertailuliukokseen lisätään sama määrä sisäistä standardia, esimerkiksi 4-allyyli-anisolia (estragolia), kun näytteessä ei ole luonnostaan estragolia. Molemmat liuokset laimennetaan 45 % vol etanoliliuksella ja injektoidaan suoraan kaasukromatografiin. Runsaasti sokereita sisältävät liköörit on uutettava ennen näytteenvalmistusta ja analyysia.

4 Reagenssit ja materiaalit

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

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

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

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

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

4.4 45 % vol etanoli

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

4.5 Standardiliuosten valmistaminen

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

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

Varastoliuokset tulee valmistaa uudelleen aina viikon välein.

4.5.1 Standardiliuos A

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

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

4.5.2 Sisäinen standardi, liuos B

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

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

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

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

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

4.5.4 Standardiliuos C

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

5 Laitteet ja välineet

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

5.2 Split/splitless-injektori

5.3 Kapillaarikolonne, joka voi olla esimerkiksi seuraavanlainen:

Pituus: 50 m,

Sisähalkaisija: 0,32 mm,

Faasin pakkuus: 0,2 µm,

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

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

6 Kromatografian ajo-olosuhteet

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

6.1 Kantajakaasu: helium, analyyttinen laatu

6.2 Virtausnopeus: 2 ml/min

6.3 Injektorin lämpötila: 250 °C

6.4 Detektorin lämpötila: 250 °C

6.5 Uunin lämpötilaolosuhteet: isoterminen, 180 °C, ajoaika 10 minuuttia

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

7 Näytteet

Näytteet on säilytettävä huoneenlämpötilassa suojassa valolta ja kylmältä.

8 Mittauksen suoritus

8.1 Estragolin tutkiminen näytteestä

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

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

8.2 Tutkittavien näytteiden valmistaminen

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

8.3 Nollanäyte

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

8.4 Lineaarisuuden testaus

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

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

$R = \text{trans-anetoliin korkeus tai pinta-ala jaettuna estragoliin korkeudella tai pinta-alalla.}$

Kuvaajan pitäisi olla lineaarinen.

8.5 Määrittäminen

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

9 Vastekertoimen laskeminen

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

9.1 Vastekertoimen (RF_i) laskeminen

Vastekerroin lasketaan seuraavasti:

$$RF_i = (C_i / \text{pinta-ala tai korkeus}_i) * (\text{pinta-ala tai korkeus}_{is} / C_{is})$$

missä:

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

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

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

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

RF_i lasketaan standardiliuoksen C (4.5.4) viidestä rinnakkaismäärittäyksestä.

9.2 Vasteen lineaarisuuden tutkimiseen käytettävien lineaarisuusstandardien analysointi

Injektoidaan lineaarisuusstandardiliuokset (4.5.3).

9.3 Näytteen analysointi

Injektoidaan tutkittava näyteliuos (8.2).

10 Tulosten laskeminen

Trans-anetolin konsentraatio lasketaan seuraavasta kaavasta:

$$c_i = C_{is} * (\text{pinta-ala tai korkeus}_i / \text{pinta-ala tai korkeus}_{is}) * RF_i$$

missä:

c_i on tutkittavan näytteen trans-anetolikoncentraatio

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

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

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

RF_i on vastekerroin (laskettu kohdan 9.1 mukaisesti)

Trans-anetolikoncentraatio ilmoitetaan grammoina litrassa yhden desimaalin tarkkuudella.

11 Laadunvarmistus ja laadunvalvonta

Kromatogrammien tulee olla sellaiset, että anetoli ja sisäinen standardi erottuvat toisistaan ja mahdollisista mittauksista häiritsevästä yhdisteistä. R_F -arvo lasketaan standardiliuoksen C (4.5.4) viidestä rinnakkaismäärityksestä. Jos variaatiokerroin ($CV \% = (\text{keskihajonta/keskiarvo}) \cdot 100$) on välillä $\pm 1 \%$, R_F :n keskiarvo hyväksytään.

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

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

12 Runsaasti sokeria sisältävän alkoholinäytteen ja liköörinäytteen käsittely ennen kaasukromatografianalyysiä

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

12.1 Periaate

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

12.2 Reagenssit ja materiaalit

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

12.2.1 Ammoniumsulfaatti, vedetön (CAS 7783-20-2)**12.2.2 Natriumfosfaatti, kaksimäksinen, dodekahydraatti (CAS 10039-32-4)****12.3 Laitteet ja välineet**

Erlenmeyerkolveja, jääkaappi.

12.4 Suoritus**12.4.1 Estragolin tutkiminen näytteestä**

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

12.4.2 Uutto

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

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

Suljettu kolvi pannaan jääkaappiin ($T < 5^\circ\text{C}$) vähintään kahden tunnin ajaksi.

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

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

12.4.3 Analysoitavan uuttonäytteen valmistaminen

Uutteen (12.4.2) annetaan lämmitä huoneenlämpötilaan.

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

12.5 Määrittäminen

Noudatetaan kohdassa 8.5 esitettyä menettelyä.

12.6 Tulosten laskeminen

Tulokset lasketaan seuraavan kaavan avulla:

$$C_i = (m_{is} / V) * (pinta-ala_{is} / pinta-ala_i) * R_{Fi}$$

missä:

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

V on tutkittavan näytteen tilavuus (50 ml)

R_{Fi} on vastekerroin (9.1)

$pinta-ala_i$ on trans-anetolin piikin pinta-ala

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

Tulokset ilmoitetaan grammoina litrassa yhden desimaalin tarkkuudella.

12.7 Laadunvarmistus ja laadunvalvonta

Noudatetaan kohdassa 11 esitettyä menettelyä.

13 Menetelmän suorituskykyä kuvaavat ominaisuudet (tarkkuus)

Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset:

Seuraavissa taulukoissa on esitetty anetolia koskevat arvot.

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

Laboratorioiden välinen testaus tehty vuonna 1998

Laboratorioiden määrä 16

Näytteiden määrä 10

Analyytti anetoli

Pastis:

Näytteet	A	B	C	D	E	F
Laboratorioiden määrä, kun poikkeavan tuloksen saaneet laboratoriot on poistettu	15	15	15	13	16	16
Poikkeavien tulosten määrä (laboratoriot)	1	1	1	3	—	—
Hyväksytyjen tulosten määrä	30	30	30	26	16	16
Keskiarvo g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Toistettavuuden standardipoikkeama (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Toistettavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Toistettavuusraja (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Uusittavuuden standardipoikkeama (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Uusittavuuden suhteellinen standardipoikkeama (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Uusittavuusraja (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Näytetyypit:

A pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

B pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

C pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

D pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

E pastis, yksittäinen näyte

F pastis, yksittäinen näyte

Muut aniksella maustetut tislattut alkoholijuomat:

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

Näytetyypit:

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

H anis, rinnakkaiset sokkonäytteet

I aniksella maustettu likööri, rinnakkaisnäytteet

J aniksella maustettu likööri, rinnakkaisnäytteet

VI GLYSYRRITSIIINHAPPO. GLYSYRRITSIIINHAPON MÄÄRITTÄMINEN NESTEKROMATOGRAFISESTI

1 Soveltamisala

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

2 Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin

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

3 Periaate

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

4 Reagenssit ja materiaalit

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

- 4.1 96 % vol etanoli (CAS 64-17-5)
- 4.2 Ammoniumglysyrritsinaatti, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (glysyrritsiinihapon ammoniumsuola)
(Molekyylipaino 839,98) (CAS 53956-04-0): puhtaus vähintään 90 %.
(glysyrritsiinihapon molekyylipaino 822,94)
- 4.3 Jäätikka, CH_3COOH , (CAS 64-19-7)
- 4.4 Metanoli, CH_3OH (CAS 67-56-1)
- 4.5 50 % vol etanoli
1 000 ml:aa varten (20 °C):
— 96 % vol etanolia (4.1): 521 ml
— vettä (2.0): 511 ml.
- 4.6 HPLC-eluenttien valmistus.
- 4.6.1 Eluentti A (esimerkki)
80 tilavuusosaa vettä (2.0)
20 tilavuusosaa jäätikkaa (4.3).
Poistetaan kaasut eluentista viiden minuutin ajan.
Huomaa: Jos käytettävää vettä ei ole mikrosuodatettu, on suositeltavaa suodattaa valmistettu eluentti orgaanisten liuottimien suodattimella, jonka huokoskoko on 0,45 µm tai pienempi.
- 4.6.2 Eluentti B
Metanoli (4.4)
- 4.7 Standardiliuosten valmistaminen
Kaikki standardiliuokset täytyy uusia kahden kuukauden välein.
- 4.7.1 Vertailuliuos C
Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 25 mg ammoniumglysyrritsinaattia (4.2) 100 ml:n mittapulloon. Lisätään hieman 50 % vol etanolia (4.5) ja liuotetaan ammoniumglysyrritsinaatti. Kun se on liennut, täytetään pullo merkkiin asti 50 % vol etanolilla (4.5).
Suodatetaan orgaanisille liuottimille tarkoitettulla suodattimella.
- 4.7.2 Laitteiston vasteen lineaarisuuden tarkistamiseen käytettävät standardiliuokset
1,0 g/l varastoliuos valmistetaan punnitsemalla 0,1 mg:n tarkkuudella 100 g ammoniumglysyrritsinaattia 100 ml:n mittapulloon. Lisätään hieman 50 % vol etanolia (4.5) ja liuotetaan ammoniumglysyrritsinaatti. Kun se on liennut, täytetään pullo merkkiin asti 50 % vol etanolilla (4.5).
Valmistetaan vähintään neljä muuta liuosta, jotka vastaavat 0,05, 0,1, 0,25 ja 0,5 g/l ammoniumglysyrritsiinaattia, pipetoimalla 5 ml, 10 ml, 25 ml ja 50 ml 1,0 g/l:n varastoliuosta erillisiin 100 ml:n mittapulloihin. Täytetään pullo merkkiin asti 50 % vol etanolilla (4.5) ja sekoitetaan perusteellisesti.
Suodatetaan orgaanisille liuottimille tarkoitettulla suodattimella.
- 5 **Laitteet ja välineet**
- 5.1 Analyysilaitteisto
- 5.1.1 Nestekromatografi (HPLC)
- 5.1.2 Pumppujärjestelmä, jolla voidaan saavuttaa ja ylläpitää vakiomääräinen tai ohjelmoitu virtausnopeus erittäin tarkasti.
- 5.1.3 UV-detektori: asetetaan arvoon 254 nm.
- 5.1.4 Eluenttien kaasunpoistojärjestelmä:
- 5.2 Integraattori tai piirturi, jonka suorituskkyky vastaa laitteiston muita osia.

- 5.3 Kolonni (esimerkki):
Materiaali: ruostumaton teräs tai lasi
Sisähalkaisija: 4—5 mm
Pituus: 100—250 mm
Stationääri faasi: silloitettu silika (mieluiten pallomainen), jossa on funktionaalinen oktadekyyli ryhmä (C18), maksimi hiukkaskoko: 5 µm.
- 5.4 Laboratoriolaitteet
- 5.4.1 Analyysivaaka, jonka tarkkuus on 0,1 mg
- 5.4.2 A-laadun lasisia mittavälineitä
- 5.4.3 Pienille tilavuuksille sopiva mikromembraanisuodatuslaitteisto

6 Kromatografian ajo-olosuhteet

6.1 Eluointiolosuhteet (esimerkki):

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

6.2 Detektio:

- UV = 254 nm

7 Suoritus

7.1 Alkoholijuomanäytteen valmistus.

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

7.2 Määrittäminen

Kun kromatografian olosuhteet ovat stabiilit:

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

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

missä:

- c on glysyrritsiinihapon konsentraatio tutkittavassa alkoholijuomassa (g/l)
- C on ammoniumglysyrritsinaatin konsentraatio vertailuliouksessa
- h on glysyrritsiinihappopiikin pinta-ala (tai korkeus) tutkittavassa alkoholijuomassa
- H on glysyrritsiinihappopiikin pinta-ala (tai korkeus) vertailuliouksessa
- P on vertailuaineena käytettävän ammoniumglysyrritsinaatin puhtausaste (%)
- 823 on glysyrritsiinihapon moolimassa
- 840 on ammoniumglysyrritsinaatin moolimassa.

8 Menetelmän suorituskykyä kuvaavat ominaisuudet (tarkkuus)

Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset:

seuraavassa taulukossa on esitetty glysyrritsiinihappoa koskevat arvot.

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

Laboratorioiden välinen testaus tehty vuonna	1998
Laboratorioiden määrä	16
Näytteiden määrä	5
Analyytti	glysyrritsiini-happo

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

Näytetyypit:

- A pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet
- B pastis, rinnakkaisnäytteet, joista toiseen on lisätty analyyttiä (*)
- C pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet
- D pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet
- E pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet

VII KALKONIT. PASTIKSEN KALKONIEEN NESTEKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS

1 Soveltamisala

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

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

2 Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin

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

3 Periaate

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

4 Reagenssit ja materiaalit

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

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

4.2 Asetonitriili, CH₃CN (CAS 75-05-8)

- 4.3 Vertailuaine: *Glycyrrhiza glabra* (lakritsijuuri)
- Jauhetaan lakritsijuuri (*Glycyrrhiza glabra*) karkeaksi. Sauvamaisten partikkelien keskimääräiset dimensiot: pituus 10–15 mm, paksuus 1–3 mm.
- 4.4 Natriumasetaatti, CH₃COONa (CAS 127-09-3)
- 4.5 Jäätikka, CH₃COOH, (CAS 64-19-7)
- 4.6 Liuosten valmistaminen
- 4.6.1 50 % vol etanoli
- 1 000 ml:aa varten (20 °C):
- 96 % vol etanolia (4.1): 521 ml
 - vettä (2.0): 511 ml.
- 4.6.2 Eluentti A: asetontriili
- Asetontriili (4.2), HPLC-laatu.
- 4.6.3. Eluentti B: 0,1 M natriumasetaattipuskuriliuos, pH 4,66
- Punnitaan 8,203 g natriumasetaattia (4.4), lisätään 6,005 g jäätikkaa (4.5) ja täytetään tilavuus 1 000 ml:ksi vedellä (2) mittapullossa.
- 5 **Referenssiuutteen valmistaminen *glycyrrhiza glabrata* (4.3)**
- 5.1 Punnitaan 10 g jauhattua lakritsijuurta (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) ja pannaan jauhe pyöreäpohjaiseen tislaukolviin.
- Lisätään 100 ml 50 % vol etanolia (4.6.1).
 - Keitetään tunnin ajan palautusjäähdyttimen kanssa.
 - Suodatetaan.
 - Otetaan suodos talteen myöhempää käyttöä varten.
- 5.2 Otetaan lakritsiuute suodattimesta.
- Pannaan uute pyöreäpohjaiseen tislaukolviin.
 - Lisätään 100 ml 50 % vol etanolia (4.6.1).
 - Keitetään tunnin ajan palautusjäähdyttimen kanssa.
 - Suodatetaan. Otetaan suodos talteen myöhempää käyttöä varten.
- 5.3 Lakritsijuuren uuttaminen täytyy tehdä kolme kertaa peräkkäin.
- 5.4 Yhdistetään saadut kolme suodosta.
- 5.5 Haihduta yhdistettyjen suodosten (5.4) liuotinfraasi pyöröhaihduuttimessa.
- 5.6 Liuota uutejäämä (5.5) 100 ml:aan 50 % vol etanolia (4.6.1).
- 6 **Laitteet ja välineet**
- 6.1 Analyysilaitteisto
- 6.1.1 Nestekromatografi (HPLC)
- 6.1.2 Pumppujärjestelmä, jolla voidaan saavuttaa ja ylläpitää vakiomääräinen tai ohjelmoitu virtausnopeus korkeassa paineessa
- 6.1.3 UV / näkyvän valon detektori, joka voidaan asettaa arvoille 254 ja 370 nm
- 6.1.4 Eluutin kaasunpoistojärjestelmä
- 6.1.5 Kolonniuuni, jonka lämpötilaksi voidaan asettaa 40 ± 0,1 °C
- 6.2 Integraattori tai piirturi, jonka suorituskky vastaa analyysilaitteiston muita osia

6.3 Kolonni

Materiaali: ruostumaton teräs tai lasi

Sisähalkaisija: 4—5 mm

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

6.4 Normaalit laboratoriolaitteet, muun muassa seuraavat:**6.4.1 Analyysivaaka. (tarkkuus ± 0,1 mg)****6.4.2 Palautusjäähdyttimellä varustettu tislauslaitteisto, esimerkiksi:**

- 250 ml:n pyörökolvi, jossa on lasihiosliitäntä,
- 30 cm pitkä palautusjäähdytin,
- lämmönlähde (sopivan järjestelyn avulla on vältettävä uutettavan aineen hajoaminen tai kiinnipalaminen).

6.4.3 Pyöröhaihdutin**6.4.4 Suodatuslaitteisto (esimerkiksi Büchner-suppilo)****6.5 Kromatografian ajo-olosuhteet (esimerkki)****6.5.1 Eluenttien A (4.6.2) ja B (4.6.3) gradienttiohjelma**

- Ajetaan gradientti 20/80 (v/v):sta 50/50 (v/v):een 15 minuutin aikana.
- Ajetaan gradientti 50/50 (v/v):sta 75/25 (v/v):een 5 minuutin aikana.
- Ajetaan isograattisesti 75/25 (v/v) 5 minuutin ajan.
- Kolonnin annetaan stabiloitua injektointien välillä.
- Ajetaan isograattisesti 20/80 (v/v) 5 minuutin ajan.

6.5.2 Virtausnopeus: 1 ml/min**6.5.3 UV-detektorin asetukset:**

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

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

7 Mittauksen suoritus**7.1 Alkoholiuomanäytteen valmistus**

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

7.2 Lakritsin jäännösuutteen (5.6) laimentaminen

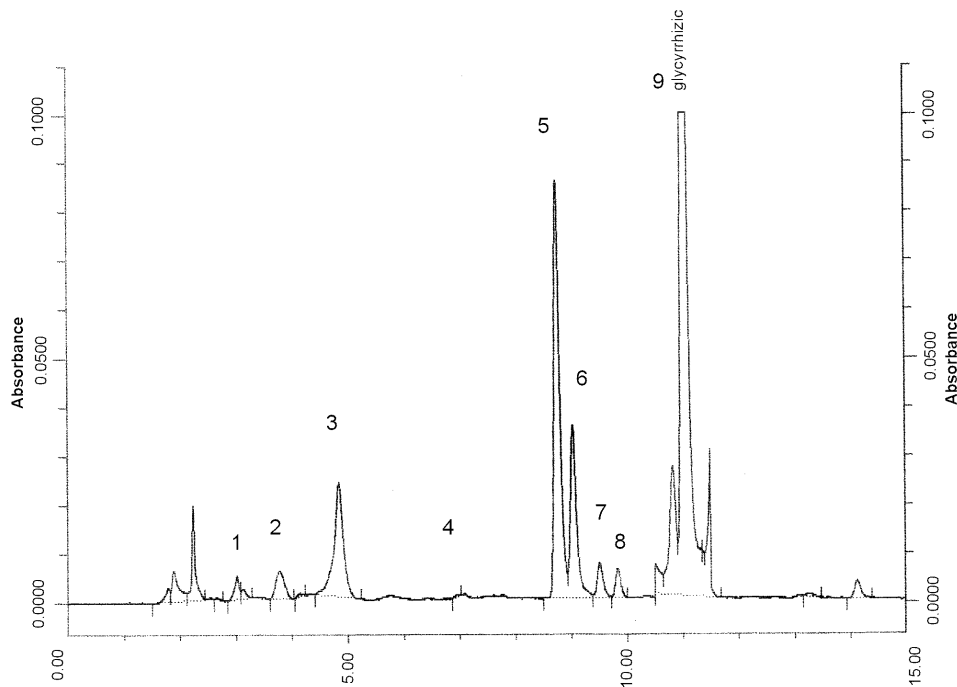
Laimennetaan ennen analyysiä yhteen kymmenesosaan 50 % vol alkoholilla (4.6.1).

7.3 Määrittäminen**7.3.1 Injektoidaan 20 µl laimennettua lakritsiuutetta (7.2). Suoritetaan analyysi edellä kuvattuja kromatografiaolosuhteita käyttäen (6.5).****7.3.2 Injektoidaan 20 µl suodatettua näytettä (7.1) (aniksella maustetun alkoholin näyte). Suoritetaan analyysi edellä kuvattuja kromatografiaolosuhteita käyttäen (6.5).****7.3.3 Verrataan kromatogrammeja keskenään. Kromatogrammien on oltava hyvin samanlaisia sillä alueella, jolla kalkonit eluoituvat (se kromatogrammin alue, joka on ajettu 370 nm:n aallonpituudella edellä kuvatuissa analyysiolosuhteissa) (katso kuva 1).**

8 Tyypillinen pastiksen kromatogrammi

Kuva 1

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



9 Menetelmän suorituskykyä kuvaavat ominaisuudet (tarkkuus)

Laboratorioiden välisen testauksen tulokset:

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

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

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

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

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

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

Näytetyypit:

- A pastis, rinnakkaiset sokkonäytteet
- B pastis, yksittäinen näyte
- C pastis, yksittäinen näyte
- D ”pastis” (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet
- E ”pastis” (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet
- F aniksella maustettu likööri (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet
- G aniksella maustettu likööri (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet
- H ouzo (ei sisällä kalkoneita), yksittäinen näyte
- I ouzo (ei sisällä kalkoneita), yksittäinen näyte
- J anis (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet
- K ”pastis” (ei sisällä kalkoneita), rinnakkaiset sokkonäytteet

IX MUNANKELTUAINEN. MUNANKELTUAISPITOISUUDEN FOTOMETRINEN MÄÄRITTÄMINEN TISLATTUISTA ALKOHOLIJUOMISTA

1 Soveltamisala

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

2 Viittaukset säännöksiin ja määräyksiin

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

3 Periaate

Munankeltuaisen etanoliin liukenevat fosforiyhdisteet uutetaan ja ne määritetään fotometrisesti fosforimolybdaattikompleksina.

4 Reagenssit ja materiaalit

- 4.1 Kahteen kertaan tislattu vesi
- 4.2 Piimaa
- 4.3 96 % vol etanoli (CAS 64-17-5)
- 4.4 15 % magnesiumasetaattiliuos (CAS 16674-78-5)
- 4.5 10 % rikkihappo (CAS 7664-93-9)

- 4.6 1 N rikkihappo
- 4.7 0,16 g/l kaliumdivetyfosfaattiliuos (CAS 778-77-0), KH_2PO_4
- 4.8 Reagenssi fosfaatin määrittämiseksi:
- Liuotetaan 20 g ammoniummolybdaattia (CAS 12054-85-2), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 400 ml:aan vettä, jonka lämpötila on 50 °C.
- Liuotetaan toisessa astiassa 1 g ammoniumvanadaattia (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3 300 ml:aan kuumaa vettä, annetaan liuoksen jäähtyä ja lisätään sitten 140 ml väkevää typpihappoa (CAS 7697-37-2). Jäähtyneet liuokset kaadetaan 1 000 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin.

5 Laitteet ja välineet

- 5.1 100 ml:n erlenmeyerkolvi
- 5.2 Ultraäänihaude (tai magneettisekoitin)
- 5.3 100 ml:n mittapullo
- 5.4 20 °C :n vesihaude
- 5.5 Suodatin (Whatman No. 4 tai vastaava)
- 5.6 Posliiniupokas (tai platinaupokas)
- 5.7 Kiehuva vesihaude
- 5.8 Keittolevy
- 5.9 Muhveliuuni
- 5.10 50 ml:n mittapullo
- 5.11 20 ml:n mittapullo
- 5.12 Spektrofotometri, jolla voidaan mitata aallonpituudella 420 nm
- 5.13 1 cm:n kyveti.

6 Näytteet

Näytteet varastoidaan huoneenlämpötilassa ennen analyysiä.

7 Mittauksen suoritus

- 7.1 Näytteenvalmistus
- 7.1.1 Punnitaan 10 g näytettä 100 ml:n erlenmeyerkolviin (5.1).
- 7.1.2 Lisätään vaihteittain 70 ml etanolia (4.3) pieninä määrinä ja sekoitetaan näytettä aina lisäyksen jälkeen. Kolvi laitetaan ultraäänihauteeseen (5.2) 15 minuutin ajaksi (tai sekoitetaan magneettisekoittimella (5.2) 10 minuutin ajan huoneenlämpötilassa).
- 7.1.3 Siirretään kolvin sisältö 100 ml:n mittapulloon (5.3) ja huuhdotaan erlenmeyerkolvi etanolilla (4.3). Täytetään merkkiin etanolilla (4.3) ja laitetaan pullo 20 °C:n vesihauteeseen (5.4). Täytetään merkkiin 20 °C:n lämpötilassa.
- 7.1.4 Lisätään hieman piimaata (4.2) ja suodatetaan (5.5), heitetään pois suodoksen ensimmäiset 20 ml.
- 7.1.5 Siirretään 25 ml suodoksesta posliiniupokkaaseen (tai platinaupokkaaseen) (5.6). Tämän jälkeen suodos väkevöidään kiehuvalle vesihauteelle (5.7) varovasti haihduttaen ja siihen lisätään 5 ml 15 % magnesiumasetaattiliuosta (4.4).
- 7.1.6 Upokas asetetaan keittolevylle (5.8) ja kuumennetaan kuivaksi.
- 7.1.7 Jäämä tuhkaataan kuumentamalla valkohehkuseksi 600 °C lämpötilassa muhveliuunissa (5.9), kunnes tuhka on valkoista — vähintään 1,5 tunnin ajan, mutta voidaan jättää uuniin yön ajaksi.
- 7.1.8 Huuhdotaan tuhka 10 ml:lla 10 % rikkihappoa (4.5) ja siirretään tislattulla vedellä (4.1) huuhtoon 50 ml:n mittapulloon (5.10). Täytetään merkkiin tislattulla vedellä (4.1) huoneenlämpötilassa. Tästä tuhkaliuksesta otetaan 5 ml fosfaatin fotometriseen määrittämiseen käytettävän näyteliuoksen valmistamiseen.
- 7.2 Fosfaatin fotometrinen määrittäminen
- 7.2.1 Vertailuliuos
- 7.2.1.1 Mitataan 10 ml 10 % rikkihappoa (4.5) 50 ml:n mittapulloon (5.10) ja täytetään merkkiin tislattulla vedellä (4.1).

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

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

7.2.1.4 Täytetään 1 cm:n kyveti (5.13) tällä vertailuliuksella.

7.2.2 Näyteliuos

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

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

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

7.2.3 Kalibrointikäyrä

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

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

7.2.3.3 Kalibrointikäyrän määrittäminen:

divelyfosfaattiliuos (ml)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8 Tulosten laskeminen

Munankeltuaispitoisuus (g/l) lasketaan seuraavasta kaavasta:

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

missä:

110	muuntokerroin 100 g:ssa munankeltuasta olevan P ₂ O ₅ :n kokonaismäärän (g) laskemiseksi,
mg P ₂ O ₅	kalibrointikäyrästä saatu arvo,
tiheys	munapohjaisen liköörin massa tilavuusyksikköä kohti (g/ml) 20 °C:n lämpötilassa,
E	punnittu munapohjaisen liköörin määrä (g),
40	tuhkaliuksen 5 ml:n osuudesta tuleva laimennuskerroin.

9 Menetelmän suorituskykyä kuvaavat ominaisuudet (tarkkuus)

Laboratorioiden välisen testauksen tilastolliset tulokset:

Seuraavassa taulukossa on esitetty munankeltuasta koskevat arvot.

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

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

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

Näytetyypit:

- A munalikööri, rinnakkaiset sokkonäytteet
- B munalikööri, rinnakkaiset sokkonäytteet
- C munalikööri, rinnakkaiset sokkonäytteet
- D munalikööri, rinnakkaisnäytteet, joista toiseen on lisätty analyyttiä (*)
- E munalikööri, rinnakkaiset sokkonäytteet