Този документ е средство за документиране и не обвързва институциите

►**B** **РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 2870/2000 НА КОМИСИЯТА**

от 19 декември 2000 година

относно определяне на референтни методи на Общността за анализ на спиртните напитки

(ОВ L 333, 29.12.2000, стр. 20)

Изменен с

		Официален вестник		
		№	страница	дата
►**M1**	Регламент (ЕО) № 2091/2002 на Комисията от 26 ноември 2002 година	L 322	11	27.11.2002

▼B

РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 2870/2000 НА КОМИСИЯТА

от 19 декември 2000 година

относно определяне на референтни методи на Общността за анализ на спиртните напитки

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 1576/89 на Съвета от 29 май 1989 г. за установяване на общи правила за дефинирането, описанието и представянето на спиртни напитки [1], изменен с Акта за присъединяване на Австрия, Финландия и Швеция, и по-специално член 4, параграф 8 от него,

като има предвид, че:

(1) Член 4, параграф 8 от Регламент (ЕИО) № 1576/89 предвижда приемане на методи, които трябва да бъдат използвани за анализ на спиртни напитки. Референтните методи трябва да се използват, за да гарантират съответствие с Регламент (ЕИО) № 1576/89 и с Регламент (ЕИО) № 1014/90 на Комисията от 24 април 1990 г. за установяване на общи правила за дефинирането, описанието и представянето на спиртни напитки [2], последно изменен с Регламент (ЕО) № 2140/98 [3], в случаите когато се извършва официален контрол или в случай на спор.

(2) Доколкото е възможно, би било полезно да се приемат общоприетите методи и да се опишат като референтни методи на Общността за анализ.

(3) С цел да се вземат под внимание научните постижения и различията в оборудването на официалните лаборатории, използването на методи, които се основават на принципи на измерване, различни от референтните методи, описани в приложението към настоящия регламент, се разрешава на отговорност на директора на лабораторията, когато тези методи предполагат наличието на достатъчни гаранции за резултатите и по-конкретно отговарят на критериите, включени в приложението към Директива 85/591/ЕИО на Съвета от 20 декември 1985 г. относно въвеждане на методи на Общността за вземане на проби и анализ с цел осъществяване на контрол на хранителните продукти, предназначени за консумация от човека [4], както и ако може да се докаже, че отклоненията в точността, повторяемостта и възпроизводимостта на получените резултати са в рамките на резултатите, получени с помощта на референтните методи, описани в настоящия регламент. Ако това условие е изпълнено, разрешава се използването на други методи за анализ. Въпреки това е важно да се уточни, че при наличие на спор другите методи не могат да заменят референтните методи.

(4) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Изпълнителния комитет по спиртните напитки,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

---

[1] ОВ L 160, 12.6.1989 г., стр. 1.
[2] ОВ L 105, 25.4.1990 г., стр. 9.
[3] ОВ L 270, 7.10.1998 г., стр. 9.
[4] ОВ L 372, 31.12.1985 г., стр. 50.

▼B

Член 1

Референтните методи на Общността за анализ на спиртни напитки, които имат за цел да гарантират съответствие с Регламент (ЕИО) № 1576/89 и Регламент (ЕИО) № 1014/90:

— при наличието на официален контрол, или

— в случай на спор,

са методите, представени в приложението към настоящия регламент.

Член 2

Чрез дерогация от член 1, първо тире се разрешава използването на други методи за анализ, на отговорност на директора на лабораторията, при условие че точността и прецизността (повторяемост и възпроизводимост) на тези методи са най-малкото равностойни на съответните референтни методи за анализ, съдържащи се в приложението.

Член 3

В случаите, когато не са установени референтни методи за анализ на Общността за откриване и квалифициране на вещества, съдържащи се в конкретна спиртна напитка, се използват следните методи:

а) методи за анализ, които са потвърдени чрез международно признати процедури и по-конкретно отговарят на критериите, посочени в приложението към Директива 85/591/ЕИО;

б) методи за анализ, които са в съответствие с препоръчваните стандарти на Международната организация по стандартизация (ISO);

в) методи за анализ, които са признати от Общото събрание на Международната организация по лозята и виното (OIV) и публикувани от нея;

г) при липса на метод, посочен в а), б) или в), и по съображения, свързани с неговата точност, повторяемост и възпроизводимост:

— метод за анализ, одобрен от съответната държава-членка.

— там, където е необходимо — който и да е друг подходящ метод за анализ.

Член 4

За целите на настоящия регламент:

а) „граница на повторяемостта“ е стойността, по-малка от или равна на тази, при която абсолютната разлика между два резултата от проби, получени при повторяеми условия (един и същ оператор, една и съща апаратура, една и съща лаборатория и кратък интервал от време), може да бъде с вероятност от 95 % (ISO 3534-1);

б) „граница на възпроизводимостта“ е стойността, по-малка от или равна на тази, при която абсолютната разлика между два резултата от проби, получени при условия на възпроизводимост (различни оператори, различна апаратура и различни лаборатории) може да бъде с вероятност от 95 % (ISO 3534-1);

в) „точност“ е близост на съответствие между даден резултат от проба и приетата референтна стойност (ISO 3534-1).

▼B

Член 5

Настоящият регламент влиза в сила на седмия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейските общности*.

Той се прилага от 1 януари 2001 г.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОПИСАНИЕ НА РЕФЕРЕНТНИТЕ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

I. Определяне на алкохолното съдържание по обем

Допълнение I: Подготовка на дестилата

Допълнение II: Измерване на плътността на дестилата

— Метод А = пикнометрия

— Метод Б = електронна денсиметрия

— Метод В = денсиметрия с използване на хидростатични везни

II. Определяне на общия сух екстракт чрез гравиметрия

III. Определяне на летливите вещества и на метанола

III.1. Общи бележки

III.2. Летливи сродни вещества: алдехиди, висши алкохоли, етилацетат и метанол (чрез газова хроматография)

III.3. Летливи киселини (p.m.)

IV. Циановодородна киселина (p.m.)

V. Анетол ►M1 ——————— ◄

VI. Глициризова (glycyrrhizic) киселина ►M1 ——————— ◄

VII. Халкони ►M1 ——————— ◄

VIII. Захари, общо (p.m.)

IX. Яйчен жълтък ►M1 ——————— ◄

▼B

I. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АЛКОХОЛНОТО СЪДЪРЖАНИЕ НА СПИРТНИТЕ НАПИТКИ ПО ОБЕМ

Въведение

Референтният метод включва две приложения:

Допълнение I: Подготовка на дестилата

Допълнение II: Измерване на плътността на дестилата

1. **Обхват**

Методът е подходящ за определяне на действителното алкохолно съдържание на спиртните напитки по обем.

2. **Нормативни референции**

ISO 3696:1987: Вода за аналитична лабораторна употреба — Спецификации и методи на изследване

3. **Термини и дефиниции**

3.1. *Референтна температура*:

Референтната температура за определяне на алкохолното съдържание по обем, плътност и специфично тегло на спиртните напитки е 20 °C.

Бележка 1: Терминът „при температура °C“ се отнася за всяко определяне (на плътност или на алкохолно съдържание по обем), изразено в температура, различна от референтната температура от 20 °C.

3.2. *Плътност*:

Плътността е масата на единица обем във вакуум на спиртните напитки при 20 °C и се изразява по следния начин: $\rho_{20\ °C}$ или ρ_{20}.

3.3. *Специфично тегло:*

Специфичното тегло е съотношението, изразено като десетично число, между плътността на спиртните напитки при 20 °C спрямо плътността на водата при същата температура. То се изразява със символа $d_{20\ °C/20\ °C}$ или $d_{20/20'}$ или просто с d, когато се изключва възможността от грешка. Измерената характеристика трябва да бъде посочена изрично в удостоверението за анализ само чрез горепосочените символи.

Бележка 2: Специфичното тегло може да се получи и от плътността ρ_{20} при 20 °C:

$\rho_{20} = 998,203 \times d_{20/20}$ или $d_{20/20} = \rho_{20}/998,203$ където 998,203 означава плътността на водата при температура 20 °C.

3.4. *Действително алкохолно съдържание по обем*:

Действителното алкохолно съдържание по обем на спиртните напитки е равно на броя на литрите етилов алкохол, съдържащ се в 100 литра смес от вода и алкохол със същата плътност, каквато е плътността на алкохола или спирта след дестилация. Референтните стойности за алкохолно съдържание по обем (% vol.) при 20 °C в сравнение с плътността при 20 °C при различни смеси от вода и алкохол, които трябва да се използват, са стойностите, посочени в международната таблица, приета от Международната организация по метрология в нейната Препоръка № 22.

Общото уравнение, което се отнася за алкохолното съдържание по обем и плътност в смес от вода и алкохол при дадена температура е посочено на стр. 40 в глава „Алкохолно съдържание по обем“ на приложението към Регламент (ЕИО) № 2676/90 на

▼B

Комисията (ОВ L 272, 3.10.1990 г., стр. 1) или в наръчника по аналитични методи на МОВ (стр. 17).

Бележка 3: За ликьори и кремове, при които е много трудно да се измери точно обемното съдържание, пробата трябва да се претегли и алкохолното съдържание да се изчисли първо по маса.

Формула за превръщане:

$$\text{алкохолно съдържание по обем} = \frac{\text{ТАМ (\% маса)} \times P_{20}\text{ (проба)}}{P_{20}\text{ (алкохол)}}$$

където ASM = алкохолното съдържание по маса,

P_{20} (алкохол) = 789,24 kg/m^3

4. **Принцип**

След дестилацията алкохолното съдържание на дестилата по обем се определя с пикнометрия, електронна денсиметрия или с денсиметрия с използване на хидростатични везни.

▼B

ДОПЪЛНЕНИЕ I: ПОДГОТОВКА НА ДЕСТИЛАТА

1. **Обхват**

Методът е подходящ за подготовка на дестилати, които се използват за определяне на действителното алкохолно съдържание по обем на спиртните напитки.

2. **Принцип**

Алкохолът се дестилира с цел отделяне на етиловия алкохол и другите летливи съединения от екстрахираното вещество (съединения, които не се дестилират).

3. **Реактиви и материали**

3.1. Гранули против кипене.

3.2. Концентрирана емулсия против пенене (за крем-ликьорите).

4. **Апаратура и оборудване**

Използване на лабораторна апаратура и по-конкретно следната:

4.1. Водна баня, която може да бъде поддържана при 10 °C до 15 °C.

Водна баня, която може да бъде поддържана при 20 °C (± 0,2 °C).

4.2. Колби от клас A по 100 ml и 200 ml, които са сертифицирани съответно към 0,1 % и 0,15 %.

4.3. Апарат за дестилация:

4.3.1. Общи изисквания

Апаратът за дестилация трябва да притежава следните спецификации:

— броят на съединенията не трябва да превишава стриктния минимум, необходим за гарантиране на липса на течове,

— включване на устройство, предназначено за предотвратяване на „давене“ (пълнене на врящата течност с пара) и за регулиране на скоростта на дестилиране на богатите на алкохол пари,

— бърза и пълна кондензация на алкохолните пари,

— събиране на първите дестилационни фракции във водна среда.

Източникът на топлина трябва да се използва с подходящ топлинен дифузер, за да се предотврати пирогенна реакция с извличаното вещество.

4.3.2. Пример за подходящ апарат за дестилация е даден на фигура 1; апаратът включва следните части:

— колба с кръгло дъно, еднолитрова, със стандартно съединение от матово стъкло,

— ректификационна колона, висока най-малко 20 cm (например колона на Вигрьо),

— раменен конектор с кондензатор с прави ръбове, дълъг приблизително 10 cm (кондензатор тип Уест), поставен вертикално,

— охлаждаща серпантина с дължина 40 cm,

— изтеглена тръба, по която влиза дестилатът от дъното на градуираната събирателна колба, съдържаща малко количество вода.

Бележка: Описаната по-горе апаратура е предназначена за проби с тегло най-малко 200 ml. От друга страна по-малки проби (100 ml) могат да бъдат дестилирани с по-малка дестилационна колба, при условие че се използва средство за предпазване от изплискване.

5. **Съхранение на лабораторните проби**

Преди анализа пробите се съхраняват при стайна температура.

▼B

6. **Процедура**

Предварителна бележка:

Дестилацията може да се извърши и с процедурата, публикувана от IUPAC (1968).

6.1. Проверка на дестилационната апаратура.

Апаратът трябва да може да прави следното:

дестилацията на 200 ml разтвор от вода и алкохол с позната концентрация, близка до 50 обемни процента, не трябва да води до загуба на алкохол, превишаваща 0,1 обемен процент.

6.2. Спиртни напитки с алкохолно съдържание под 50 обемни процента

Отмерете 200 ml алкохол в мерителна колба.

Отбележете температурата на тази течност или я поддържайте на стандартна температура (20 °C).

Излейте пробата в кръглата колба на дестилационния апарат и изплакнете мерителната колба с по три кратни числа на около 20 ml дестилирана вода. Прибавете всяко количество изплакната вода към съдържанието на дестилационната колба.

Забележка: Този 60-милилитров разтвор е достатъчен за алкохол, съдържащ по-малко от 250 g сух екстракт на литър. В останалите случаи, за да избегне пиролиза, количеството изплакната вода трябва да бъде най-малко 70 ml, ако концентрацията на сух екстракт е 300 g/l, 85 ml за сух екстракт 400 g/l и 100 ml за сух екстракт 500 g/l (някои плодови ликьори и крем-ликьори). Нагласете количеството в зависимост от обема на пробата.

Прибавете няколко гранули против кипене (3.1) (както и емулсия против пенене за крем ликьорите).

Налейте 20 ml дестилирана вода в оригиналната 200-милилитрова мерителна колба, в която ще държите дестилата. Тази колба трябва да се постави на студена водна баня (4.1) (10—15 °C за спиртни напитки с аромат на анасон).

Дестилирайте, като гледате да не се получи пълнене или обгаряне, като разклащате от време на време съдържанието на колбата, докато нивото на дестилата стигне няколко милиметра под знака на скалата на мерителната колба.

Когато температурата на този дестилат падне до около 0,5 °C от началната температура на течността, долейте дестилирана вода до знака на скалата и смесете добре.

Дестилатът се използва за определяне на алкохолното съдържание по обем (допълние II).

6.3. Спиртни напитки с алкохолно съдържание над 50 обемни процента

Отмерете 100 ml алкохол в 100-милилитрова мерителна колба и го излейте в кръглата колба на дестилационния апарат.

Изплакнете няколко пъти мерителната колба с дестилирана вода и прибавете тази вода към съдържанието на кръглата дестилационна колба. Използвайте достатъчно вода, така че съдържанието на колбата да стане приблизително 230 ml.

Налейте 20 ml дестилирана вода в 200-милилитрова мерителна колба, в която ще държите дестилата. Тази колба трябва да се постави на студена водна баня (4.1) (10—15 °C за спиртни напитки с аромат на анасон).

Дестилирайте, като разклащате от време на време съдържанието на колбата, докато нивото на дестилата стигне няколко милиметра под знака на скалата на мерителната колба.

Когато температурата на този дестилат падне до около 0,5 °C от началната температура на течността, долейте дестилирана вода до знака на скалата и смесете добре.

▼B

Дестилатът се използва за определяне на алкохолното съдържание по обем (допълние II).

Забележка: Алкохолното съдържание по обем на спиртните напитки е два пъти по-голямо от алкохолното съдържание на дестилата.

▼B

ДОПЪЛНЕНИЕ II: ИЗМЕРВАНЕ НА ПЛЪТНОСТТА НА ДЕСТИЛАТА

МЕТОД А: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АЛКОХОЛНОТО СЪДЪРЖАНИЕ НА СПИРТНИТЕ НАПИТКИ ПО ОБЕМ — ИЗМЕРВАНЕ ЧРЕЗ ПИКНОМЕТРИЯ

A.1. **Принцип**

Алкохолното съдържание по обем се получава от плътността на дестилата, измерена с пикнометър.

A.2. **Реактиви и материали**

Освен ако не е постановено другояче, по време на анализа използвайте само реактиви от призната аналитична категория и вода най-малко от категория 3, съгласно дефиницията на ISO 3696:1987.

A.2.1. Разтвор на натриев хлорид (2 % w/v)

За да получите 1 литър, претеглете 20 g натриев хлорид и разтворете в 1 литър вода.

A.3. **Апаратура и оборудване**

Обичайната лабораторна апаратура и по-конкретно следното:

A.3.1. Аналитични везни с възможност за отмерване до 0,1 mg.

A.3.2. Термометър със съединение от матово стъкло, калибриран до една десета от градуса от 10 до 30 °C. Този термометър трябва да бъде сертифициран или да бъде сверен със сертифициран термометър.

A.3.3. Пикнометър от пирексово стъкло с вместимост приблизително 100 ml, с подвижен термометър с матово стъкло (A.3.2). Пикнометърът има странична тръбичка с дължина 25 mm и вътрешен диаметър (максимум) 1 mm, която свършва в конично съединение. По желание могат да се използват други пикнометри, като тези, описани в ISO 3507, например с вместимост 50 ml.

A.3.4. Бутилка тара със същия външен обем (до 1 ml вътрешно), както и пикнометъра, и с маса, равна на масата на пикнометъра, напълнен с течност с плътност 1,01 (разтвор на натриев хлорид A.2.1).

A.3.5. Кожух с термоизолация, който прилепва добре към тялото на пикнометъра.

Бележка 1: Методът за определяне на плътността *in vacuo* на спиртните напитки изисква наличието на везни с две блюда, пикнометър и бутилка тара със същия външен обем за неутрализиране на задържането на повърхността на водата в който и да е момент. Тази проста техника може да се използва и с помощта на везни с едно блюдо, при условие че бутилката тара се претегля отново с оглед да се контролират промените в задържането на въздуха на повърхността на водата в който и да е момент.

A.4. **Процедура**

Предварителни бележки:

Описана е следната процедура с използване на 100-милилитров пикнометър с цел определяне на алкохолното съдържание; така се получава най-голяма точност. От друга страна може да се ползва и по-малък пикнометър, например 50-милилитров.

A.4.1. Калибриране на пикнометъра

Пикнометърът се калибрира чрез определяне на следните параметри:

— тарата на празния пикнометър,

▼B

— обемът на пикнометъра при 20 °C,

— масата на запълнения с вода пикнометър при 20 °C.

A.4.1.1. Калибриране с използване на везни с едно блюдо:

Определете:

— масата на чистия сух пикнометър (P),

— масата на пълния с вода пикнометър при t °C (P1),

— масата на бутилката тара (T0)

A.4.1.1.1. Претеглете чистия сух пикнометър (P).

A.4.1.1.2. Напълнете внимателно пикнометъра с дестилирана вода при стайна температура и нагласете термометъра.

Избършете грижливо пикнометъра, докато го изсушите, и го поставете в термоизолиращия кожух. Раздрусайте, като обръщате съда, докато показанията на термометъра станат постоянни.

Нагласете струята за пикнометъра при горния ръб на страничната тръба. Разчетете внимателно температурата в t °C и, ако е необходимо, поправете възможните неточности.

Претеглете пълния с вода пикнометър (P1).

A.4.1.1.3. Претеглете бутилката тара (T0).

A.4.1.1.4. Изчисление

— тара на празния пикнометър = P – m

където m е масата на въздуха в пикнометъра.

m = 0,0012 × (P1 – P)

Бележка 2: 0,0012 е плътността на сухия въздух при 20 °C и при налягане 760 mm Hg

— обем на пикнометъра при 20 °C:

$$V_{20\,°C} = [P1 - \{P - m\}] \times F_t, 1$$

където F_r е факторът на температурата t °C, взет от таблица I от Глава 1 „Плътност и специфично тегло“ на приложението към Регламент (ЕИО) № 2676/90 (стр. 10).

$V_{20\,°C}$ трябва да бъде измерен с точност до 0,001 ml.

— масата на водата в пикнометъра при 20 °C:

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ където 0,998203 е плътността на водата при 20 °C.

Бележка 3: Ако е необходимо, може да се използва стойността 0,99715 на плътността във въздуха, а алкохолното съдържание да се изчисли по отношение на съответната плътност във въздуха, съгласно таблиците на митата и акцизите.

A.4.1.2 . Метод на калибриране с помощта на везни с две блюда:

A.4.1.2.1. Поставете бутилката тара на лявото блюдо, а чистия сух пикнометър заедно със събиращия механизъм на дясното. Уравновесете ги, като поставяте теглилки от страна на пикнометъра: p грама.

A.4.1.2.2. Напълнете внимателно пикнометъра с дестилирана вода при стайна температура и нагласете термометъра; изсушете грижливо пикнометъра и го поставете в термоизолиращия кожух; раздрусайте, като обръщате съда, докато показанията на термометъра станат постоянни.

▼B

Нагласете много точно нивото до горния ръб на страничната тръбичка. Изчистете страничната тръбичка, нагласете събиращия механизъм; разчетете грижливо температурното показание t °C и, ако е необходимо, внесете съответните поправки в температурната скала.

Претеглете пълния с вода пикнометър; теглото в грамове p′ дава равновесието.

A.4.1.2.3. Изчисление

— тара на празния пикнометър = p + m

където m е масата на въздуха в пикнометъра.

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

— обем на пикнометъра при 20 °C:

$V_{20\,°C} = (p + m - p') \times F_t,1$

където F_r е факторът на температурата t °C, взет от таблица I от глава 1 „Плътност и специфично тегло“ на приложението към Регламент (ЕИО) № 2676/90 (стр. 10).

$V_{20\,°C}$ трябва да бъде измерен с точност до 0,001 ml.

— масата на водата в пикнометъра при 20 °C:

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ където 0,998203 е плътността на водата при 20 °C.

A.4.2. Определяне на алкохолното съдържание на пробата за изследване

A.4.2.1. С използване на везни с едно блюдо.

A.4.2.1.1. Претеглете бутилката тара, тегло T1.

A.4.2.1.2. Претеглете пикнометъра с подготвения дестилат (виж допълнение I), P2 е неговото тегло при t °C.

A.4.2.1.3. Изчисление

— dT = T1 – T10

— масата на празния пикнометър към момента на измерване

= P – m + dT

— масата на течността в пикнометъра при t °C

= P2 – (P – m + dT)

— плътността при t °C в g/ml

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

— изразете плътността при t °C в килограми на m^3, като умножите $\rho_{t\,°C}$ по 1 000; стойността се означава с ρ_r.

— коригирайте ρ_r до 20, като използвате таблицата на плътностите ρ_r за смеси от вода и алкохол (таблица II от допълнение II към „Наръчник на OIV за аналитични методи“,1994 г., стр. 17—29).

В таблицата намерете хоризонталната линия, която отговаря на температурата T в цели градуси непосредствено под t °C, най-малката плътност над ρ_r. Използвайте разликата в таблицата под тази плътност, за да изчислите плътността ρ_r на алкохола при температура T в цели градуси.

— Като използвате цялата температурна скала, изчислете разликата между плътността ρ′ в таблицата непосредствено над ρ_r и изчислената плътност ρ_r. Разделете тази разлика на разликата в таблицата, която ще намерите вдясно от плътността ρ′. Коефициентът представлява десетичната част на алкохолното съдържание, а цялото число на алкохолното съдържание ще намерите в горната част на колоната, в която се намира плътността ρ′ (Dt, алкохолно съдържание).

▼B

Забележка 4: По избор дръжте пикнометъра във водна баня, която поддържате на 20 °C (± 0,2 °C), когато вземате показанията.

A.4.2.1.4. Резултат

Като използвате плътността ρ_{20}, изчислете действителното алкохолно съдържание с помощта на таблиците на алкохолното съдържание, дадени по-нататък:

Таблицата, която дава стойността на алкохолното съдържание по обем (% vol.) при 20 °C като функция на плътността при 20 °C на смеси от вода и алкохол, е международната таблица, приета от Международната правна организация по метрология в нейната Препоръка № 22.

A.4.2.2. Метод с използване на везни с едно блюдо

A.4.2.2.1. Претеглете пикнометъра с готовия дестилат (виж част I); p″ е масата при t °C.

A.4.2.2.2. Изчисление

— масата на течността в пикнометъра при t °C

= p + m – p″

— плътността при t °C в g/ml

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

— Изразете плътността при t °C в килограми на m^3 и направете температурната корекция с цел да изчислите алкохолното съдържание при 20 °C, както е посочено по-горе, с цел да се ползват везни с едно блюдо.

A.5. **Характеристики на метода (прецизност)**

A.5.1. Статистически резултати от междулабораторното изследване

Следните данни бяха получени в резултат на международно проучване на изпълнението на метода, извършено в съответствие с международно приетите процедури [1] [2].

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	20
Брой проби	6

Проби	A	Б	В	Г	Д	Е
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	19	20	17	19	19	17
Брой на големите различия (лаборатории)	1	—	2	1	1	3
Брой на приетите резултати	38	40	34	38	38	34
Средна стойност ($\bar{n}$) в обемни проценти	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Норма на повторяемост (S_r) в обемни проценти	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Граница на повторяемостта (r) в обемни проценти	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53

▼**B**

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) в обемни проценти	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53

▼B

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Граница на възпроизводимостта (R) в обемни проценти	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Тип проби:
А Плодов ликьор, разделяне на нивата (*).
Б Бренди; слепи дубликати.
В Уиски; слепи дубликати.
Г Грапа; разделяне на нивата (*).
Д Аквавит; разделяне на нивата (*).
Е Ром; разделяне на нивата (*).

МЕТОД Б: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ДЕЙСТВИТЕЛНОТО АЛКОХОЛНО СЪДЪРЖАНИЕ ПО ОБЕМ НА СПИРТНИТЕ НАПИТКИ — ИЗМЕРВАНЕ С ЕЛЕКТРОННА ДЕНСИМЕТРИЯ (ОСНОВАВАЩА СЕ НА РЕЗОНАНСНИ ЧЕСТОТНИ ТРЕПТЕНИЯ НА ОБРАЗЕЦ В ОСЦИЛИРАЩА КЛЕТКА)

Б.1. **Принцип**

Плътността на течността се определя с електронно измерване на трептенията на вибриращa тръба с U-образна форма. За да се извърши това измерване, образецът се поставя в осцилираща система, чиято специфична честота на трептене се изменя от прибавената маса.

Б.2. **Реактиви и материали**

Освен ако не е постановено другояче, по време на анализа използвайте само реактиви от призната аналитична категория и вода най-малко от категория 3, съгласно дефиницията на ISO 3696:1987.

Б.2.1. Ацетон (CAS 686-52-4) или чист алкохол

Б.2.2. Сух въздух.

Б.3. **Апаратура и оборудване**

Обичайната лабораторна апаратура и по-конкретно следното:

Б.3.1. Денсиметър с дигитален дисплей

Електронният денсиметър за извършване на тези измервания трябва да може да изразява плътността в g/ml до петия знак след десетичната запетая.

Бележка 1: Денсиметърът трябва да бъде поставен на много стабилна основа, която е изолирана от всякакъв вид трептения.

Б.3.2. Регулиране на температурата.

Дейността на денсиметъра е валидна само ако измерващата клетка е свързана с вграден терморегулатор, който може да постигне същата температурна стабилност с точност от ± 0,02 °C или повече.

Бележка 2: Прецизното нагласяне и контролът върху температурата в измерващата клетка са много важни, защото грешка от 0,1 °C може да доведе до отклонение в плътността от порядъка на 0,1 kg/m^3.

Б.3.3. Прости инжекционни спринцовки или автоматичен уред за вземане на проби.

Б.4. **Процедура**

Б.4.1. Калибриране на денсиметъра

Когато се употребява за пръв път, апаратът трябва да се калибрира в съответствие с инструкциите на производителя. Той трябва да се калибрира редовно и да се сверява със сертифициран референтен образец или с вътрешнолабораторен референтен разтвор, въз основа на сертифицирана референтен образец.

▼B

Б.4.2. Определяне на плътността на пробата

Б.4.2.1. Ако е необходимо, преди измерването почистете и изсушете клетката с ацетон или с чист спирт и сух въздух. Изплакнете клетката с пробата.

Б.4.2.2. Инжектирайте пробата в клетката (използвайте спринцовка или автоматичен уред за вземане на проби), докато клетката се напълни догоре. По време на пълнението на клетката се уверете дали въздушните мехурчета са напълно изчезнали. Пробата трябва да бъде хомогенна и не трябва да съдържа никакви твърди частици. Всякакви суспендирани вещества трябва да бъдат отстранени чрез филтриране преди анализа.

Б.4.2.3. След като стабилизирате резултатите, отбележете плътността ρ_{20} или алкохолното съдържание, което отчита денсиметърът.

Б.4.3. Резултат

Когато използвате плътност ρ_{20}, изчислете действителното алкохолно съдържание, като използвате таблиците за алкохолно съдържание, дадени по-долу.

Таблицата, която дава стойността на алкохолното съдържание по обем (% vol.) при 20 °C като функция на плътността при 20 °C на смеси от вода и алкохол, е международната таблица, приета от Международната правна организация по метрология в нейната Препоръка № 22.

Б.5. **Характеристики на метода (прецизност)**

Б.5.1. Статистически резултати от междулабораторното изследване

Следните данни бяха получени в резултат на международно проучване на изпълнението на метода, извършено в съответствие с международно приетите процедури [1] [2].

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	16
Брой проби	6

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	11	13	15	16	14	13
Брой на големите различия (лаборатории)	2	3	1	—	1	2
Брой на приетите резултати	22	26	30	32	28	26
Средна стойност ($\bar{n}$) в обемни проценти	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) в обемни проценти	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Граница на повторяемостта (r) в обемни проценти	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) в обемни проценти	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34

▼B

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Граница на възпроизводимостта (R) в обемни проценти	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Тип проби:
А Плодов ликьор, разделяне на нивата (*).
Б Бренди; слепи дубликати.
В Уиски; слепи дубликати.
Г Грапа; разделяне на нивата (*).
Д Аквавит; разделяне на нивата (*).
Е Ром; разделяне на нивата (*).

МЕТОД В: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ДЕЙСТВИТЕЛНОТО АЛКОХОЛНО СЪДЪРЖАНИЕ ПО ОБЕМ НА СПИРТНИТЕ НАПИТКИ — ИЗМЕРВАНЕ С ДЕНСИМЕТРИЯ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ХИДРОСТАТИЧНИ ВЕЗНИ

В.1. **Принцип**

Алкохолното съдържание на спиртните напитки се измерва с денсиметрия с помощта на хидростатични везни, въз основа на принципа на Архимед, съгласно който всяко тяло, потопено в течност, среща вертикален тласък от течността в посока нагоре, равен на теглото на изместената течност.

В.2. **Реактиви и материали**

Освен ако не е постановено другояче, по време на анализа използвайте само реактиви от призната аналитична категория и вода най-малко от категория 3, съгласно дефиницията на ISO 3696:1987.

В.2.1. Почистващ разтвор (натриев хидроксид, 30 % w/v) за поплавъка

За да приготвите 100 ml, отмерете 30 g натриев хидроксид и допълнете до искания обем, като използвате 96 % етанол.

В.3. **Апаратура и оборудване**

Обичайната лабораторна апаратура и по-конкретно следното:

В.3.1. Хидростатични везни с едно блюдо, с чувствителност 1 mg.

В.3.2. Поплавък с обем най-малко 20 ml, специално пригоден за везните, суспендиран с нишка с диаметър, който не е по-голям от 0,1 mm.

В.3.3. Мерителен цилиндър с обозначено ниво. Поплавъкът трябва да може да влезе много добре в цилиндъра, под градуирания знак за нивото; през повърхността на течността може да мине само поддържащият конец. Вътрешният диаметър на мерителния цилиндър трябва да бъде поне с 6 mm по-широк от поплавъка.

В.3.4. Термометър (или сонда за измерване на температурата), градуиран в степени и десети от степента, от 10 до 40 °C, калибриран до 0,05 °C.

В.3.5. Теглилки, калибрирани от одобрен сертифициращ орган.

Бележка 1: Може да се използват и везни с две блюда; принципът е описан в глава 1 „Плътност и специфично тегло“ на приложението към Регламент (ЕИО) № 2676/90 (стр. 7).

В.4. **Процедура**

Поплавъкът и мерителният цилиндър трябва да се почистват след всяко измерване с дестилирана вода, да се подсушават с мека лабораторна хартия, която не оставя влакна, и да се изплакват с разтвора, чиято плътност предстои да бъде определена. Изследванията трябва да се направят, веднага след стабилизирането на апарата, за да се ограничи загубата чрез изпаряване.

В.4.1. Калибриране на везните

Въпреки че везните обикновено имат вътрешна система за калибриране, хидростатичните везни трябва да могат да бъдат кали-

▼B

брирани с теглилки, проверени от официален сертифициращ орган.

B.4.2. Калибриране на поплавъка

B.4.2.1. Напълнете мерителния цилиндър до обозначеното ниво с двойно дестилирана вода (или с вода с еквивалентна чистота, например микрофилтрирана вода с проводимост 18,2 MΩ/cm при температура между 15 и 25 °C, но за предпочитане е при температура 20 °C.

B.4.2.2. Поставете поплавъка и термометъра, разбъркайте, разчетете показанието на уреда за плътността на течността и, ако е необходимо, коригирайте показанието, така че то да е равно на това на водата при температурата на измерване.

B.4.3. Контролирайте с помощта на разтвор от вода и алкохол.

B.4.3.1. Напълнете мерителния цилиндър до знака на скалата със смес от вода и алкохол с познато съдържание при температура между 15 и 25 °C, но за предпочитане при температура от 20 °C.

B.4.3.2. Поставете поплавъка и термометъра, разбъркайте, разчетете показанието на апарата за плътността на течността (или за алкохолното съдържание, ако това е възможно). Така установеното алкохолно съдържание трябва да бъде еднакво с алкохолното съдържание, измерено преди това.

Бележка 2: Този разтвор с познато алкохолно съдържание може да се използва и за калибриране на поплавъка, вместо двойно дестилираната вода.

B.4.4. Измерване на плътността на дестилата (или на неговото алкохолно съдържание, ако апаратът позволява това).

B.4.4.1. Излейте пробния образец в мерителния цилиндър до знака на скалата.

B.4.4.2. Поставете поплавъка и термометъра, разбъркайте, разчетете показанието на апарата за плътността на течността (или за алкохолното съдържание, ако това е възможно). Отбележете температурата, ако се измерва плътността при t °C.

B.4.4.3. Коригирайте ρ_t до 20, като използвате таблицата на плътностите ρ_t за смеси от вода и алкохол (таблица II от приложение II към „Наръчник на OIV за аналитични методи“, 1994 г., стр. 17—29).

B.4.5. Почистване на поплавъка и мерителния цилиндър.

B.4.5.1. Поставете поплавъка в разтвора за почистване на поплавъка, в мерителния цилиндър.

B.4.5.2. Оставете го да кисне в продължение на един час, като от време на време разклащате поплавъка.

B.4.5.3. Изплакнете обилно първо с чешмяна вода, след това с дестилирана вода.

B.4.5.4. Изсушете с мека лабораторна хартия, която не оставя влакна.

Извършете процедурата, когато поплавъкът се използва за първи път, след което редовно, в зависимост от нуждите.

B.4.6. Резултат

Като използвате плътността ρ_{20}, изчислете действителното алкохолно съдържание с помощта на таблиците за алкохолно съдържание, дадени по-долу.

Таблицата, която дава стойността на алкохолното съдържание по обем (% vol.) при 20 °C като функция на плътността при 20 °C на смеси от вода и алкохол, е международната таблица, приета от Международната правна организация по метрология в нейната Препоръка № 22.

B.5. **Характеристики на метода (прецизност)**

B.5.1. Статистически резултати от междулабораторното изследване

Следните данни бяха получени в резултат на международно проучване на изпълнението на метода, извършено в съответствие

▼B

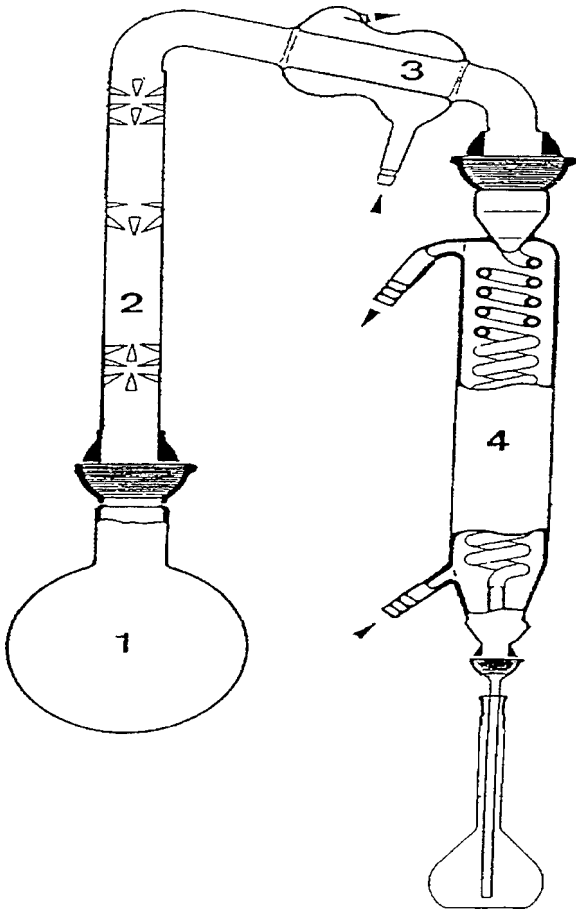
с международно приетите процедури [1] [2].

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	12
Брой проби	6

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	12	10	11	12	11	9
Брой на големите различия (лаборатории)	—	2	1	—	1	2
Брой на приетите резултати	24	20	22	24	22	18
Средна стойност ($\bar{n}$) в обемни проценти	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) в обемни проценти	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Граница на повторяемостта (r) в обемни проценти	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) в обемни проценти	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Граница на възпроизводимостта (R) в обемни проценти	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Тип проби:
А Плодов ликьор, разделяне на нивата (*).
Б Бренди; слепи дубликати.
В Уиски; слепи дубликати.
Г Грапа; разделяне на нивата (*).
Д Аквавит; разделяне на нивата (*).
Е Ром; разделяне на нивата (*).

▼B



Фигура 1. Апарат за дестилация за измерване на алкохолното съдържание по обем на спиртни напитки

1. Еднолитрова кръгла колба със стандартно сферично съединение от матово стъкло.

2. Ректификационна колона на Вигрьо с дължина 20 cm.

3. 10-сантиметров кондензатор тип Уест с вертикални ръбове.

4. Охлаждаща серпантина с дължина 40 cm.

▼B

II. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОБЩИЯ СУХ ЕКСТРАКТ В СПИРТНИТЕ НАПИТКИ ЧРЕЗ ГРАВИМЕТРИЯ

1. **Обхват**

Регламент (ЕИО) № 1576/89 предписва този метод само за аквавит, в който сухият екстракт е ограничен до 15 g/l.

2. **Нормативни референции**

ISO 3696:1987: Вода за лабораторна употреба — Спецификации и методи на изследване.

3. **Дефиниция**

Общото количество сухо вещество или сух екстракт включва всички вещества, които не са летливи при конкретни физически условия.

4. **Принцип**

Претегляне на утайката, останала след изпаряване на спирта на кипяща водна баня и сушене в пещ за сушене.

5. **Апаратура и оборудване**

5.1. Цилиндрична изпарителна ваничка с плоско дъно и с диаметър 55 mm.

5.2. Кипяща водна баня.

5.3. Пипета от 25 ml, клас А.

5.4. Пещ за сушене.

5.5. Сушилня.

5.6. Аналитични везни с точност до 0,1 mg.

6. **Вземане на проби**

Пробите се съхраняват на стайна температура преди анализа.

7. **Процедура**

7.1. С пипета се слага 25 ml спирт, съдържащ по-малко от 15 g/l сухо вещество, в предварително претеглена цилиндрична изпарителна ваничка с диаметър 55 mm. По време на първия час на изпаряването, изпарителната ваничка се поставя върху капака на кипяща водна баня, така че течността да не заври, тъй като това би довело до загуби чрез разплискване. Оставете да постои още един час в пряк контакт с парата на кипящата водна баня.

7.2. Завършете сушенето, като поставите изпарителната ваничка в пещ за сушене при температура 105 °C, ±3 °C, в продължение на два часа. Оставете изпарителната ваничка да изстине в сушилня и претеглете изпарителната ваничка и нейното съдържание.

8. **Изчисление**

Масата на утайката, умножена по 40, е равна на сухия екстракт, съдържащ се в спирта, и трябва да се изрази в g/l до първия десетичен знак след десетичната запетая.

9. **Характеристики на метода (прецизност)**

9.1. Статистически резултати от междулабораторното изследване

Следните данни бяха получени в резултат на международно проучване на изпълнението на метода, извършено в съответствие с международно приетите процедури [1] [2].

▼**B**

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	10
Брой проби	4

Проби	А	Б	В	Г
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	9	9	8	9
Брой на големите различия (лаборатории)	1	1	2	—
Брой на приетите резултати	18	18	16	18
Средна стойност ($\bar{n}$) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Граница на повторяемостта (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Граница на възпроизводимостта (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Ром; разделяне на нивата.
В Грапа; разделяне на нивата.
Г Аквавит; разделяне на нивата.

▼B

III. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛЕТЛИВИТЕ ВЕЩЕСТВА И МЕТАНОЛА В СПИРТНИТЕ НАПИТКИ

III.1. ОБЩИ БЕЛЕЖКИ

1. **Дефиниции**

Регламент (ЕИО) № 1576/89 определя минималните нива на летливите съединения, различни от етанол и метанол, за няколко вида спиртни напитки (ром, спиртни напитки с лозарски произход, плодови спиртни напитки, и др.). Само за тази поредица от напитки, тези нива по принцип се считат за еквивалентни на сбора от концентрациите на:

1. летливи киселини, изразени като оцетна киселина;
2. алдехиди, изразени като етанал чрез сбора на етанал (ацеталдехид) и етаналовата фракция, съдържаща се в 1,1-диетилоксиетан (ацетал);
3. следните висши алкохоли: пропан-1-ол, бутан-1-ол, бутан-2-ол, 2-метилпропан-1-ол при анализ с индивидуален алкохол и 2-метилбутан-1-ол, както и 3-метилбутан-1-ол при анализ с индивидуален алкохол, или сборът от двете;
4. етилацетат.

Следните методи се считат за конвенционални за измерване на летливите съединения:

— летливи киселини чрез летлива киселинност;

— алдехиди (етанал и ацетал), етилацетат и алкохоли чрез газова хроматография (GPC).

2. **Анализ чрез газова хроматография на летливите съединения**

Анализът чрез газова хроматография на летливи съединения, различни от тези, посочени по-горе, може да се окаже особено интересен като средство за определяне както на произхода на суровината, използвана при дестилацията, така и на действителните условия на дестилацията.

Някои спиртни напитки съдържат други летливи съединения, например ароматични съединения, които са характерни за суровините, използвани при получаване на алкохола, за букета на спиртната напитка и за специалните условия, характерни за подготовката на спиртната напитка. Тези съединения са важни за оценяване на изискванията, определени в Регламент (ЕИО) № 1576/89.

III.2. ОПРЕДЕЛЯНЕ ЧРЕЗ ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ НА СРОДНИТЕ ЛЕТЛИВИ СЪСТАВКИ: АЛДЕХИДИ, ЧИСТ АЛКОХОЛ, ЕТИЛАЦЕТАТ И МЕТАНОЛ

1. **Обхват**

Този метод е подходящ за определяне на 1,1-диетоксиетан (ацетал), 2-метилбутан-1-ол (активен амилов алкохол), 3-метилбутан-1-ол (изоамилов алкохол), метанол (метилов алкохол), етилетаноат (етилацетат), бутан-1-ол (n-бутанол), бутан-2-ол (sec-бутанол), 2-метилпропан-1-ол (изобутилов алкохол), пропан-1-ол (n-пропанол) и етанал (ацеталдехид) в спиртните напитки чрез газова хроматография. Методът използва вътрешен образец, например пентан-3-ол. Концентрациите на аналитите се изразяват в грамове на 100 литра абсолютен алкохол; алкохолното съдържание на продукта трябва да се определи преди анализа. Спиртните напитки, които могат да бъдат анализирани с помощта на този метод, включват уиски, бренди, ром, бяло вино, плодови спиртни напитки и джиброва гроздова ракия.

2. **Нормативни референции**

ISO 3696:1987: Вода за лабораторна употреба — Спецификации и методи на изследване.

▼B

3. **Дефиниция**

Сродните съставки са летливи вещества, които се образуват заедно с етанола по време на ферментацията, дестилацията и зреенето на спиртните напитки.

4. **Принцип**

Сродните съставки в спиртните напитки се определят с пряко инжектиране на спиртната напитка — или на подходящо разредена спиртна напитка — в системата за газова хроматография (GC). Преди инжектирането към спиртната напитка се прибавя съответен вътрешен образец. Сродните съставки се отделят чрез програмиране на температурата в подходяща колона и се откриват с помощта на газов йонизиращ сигнализатор (FID). Концентрацията на всяка сродна съставка се определя по отношение на вътрешния образец чрез фактори на реагирането, които се получават по време на калибриране при същите условия в хроматографа, както тези при анализа на спиртните напитки.

5. **Реактиви и материали**

Освен ако не е постановено другояче, използвайте само реактиви с чистота, по-висока от 97 %, купени от доставчик, акредитиран по ISO, със съпътстващо удостоверение за чистота и за липса на всякакви сродни съставки при пробно разреждане (това може да се установи чрез инжектиране на индивидуални проби на сродни съставки при пробното разреждане в условията на GC, посочени в 6.4), само вода най-малко от клас 3, съгласно дефиницията по ISO 3696. Ацеталът и ацеталдехидът могат да се съхраняват на тъмно при температура < 5 °C; всички други реактиви могат да се съхраняват при стайна температура.

5.1. Чист етанол (CAS 64-17).

5.2. Метанол (CAS 67-56-1).

5.3. Пропан-1-ол (CAS 71-23-8).

5.4. 2-метилпропан-1-ол (CAS 78-33-1).

5.5. Приемливи вътрешни образци: пентан-3-ол (CAS 584-02-01), пентан-1-ол (CAS 71-41-0), 4-метилпентан-1-ол (CAS 626-89-1) или метилнонаноат (CAS 1731-84-6).

5.6. 2-метилбутан-1-ол (CAS 137-32-6).

5.7. 3-метилбутан-1-ол (CAS 123-51-3).

5.8. Етилацетат (CAS 141-78-6).

5.9. Бутан-1-ол (CAS 71-36-3).

5.10. Бутан-2-ол (CAS 78-92-2).

5.11. Ацеталдехид (CAS 75-07-0).

5.12. Ацетал (CAS 105-57-7).

5.13. 40 % разтвор на етанол

За да приготвите 400 ml/l разтвор на етанол, излейте 400 ml етанол (5.1) в еднолитрова мерителна колба, добавете дестилирана вода до нужния обем и разбъркайте добре.

5.14. Подготовка и съхранение на разтворите образци (процедура, която се отнася за валидирания метод).

Всички разтвори образци трябва да се съхраняват при температура < 5 °C и се приготвят всеки месец, за да бъдат пресни. Масата на съставките и разтворите се измерва с точност до 0,1 mg.

5.14.1. Разтвор образец — A

С помощта на пипета поставете следните реактиви в мерителна колба от 100 ml, съдържаща приблизително 60 ml разтвор на етанол (5.13) с цел да сведете до минимум изпаряването, добавете разтвор на етанол (5.13) до необходимия обем и

▼B

разбъркайте добре. Отбележете си теглото на колбата, на всеки прибавен компонент и общото крайно тегло на съдържанието.

Компонент	Обем (ml)
Метанол (5.2)	3,0
Пропан-1-ол (5.3)	3,0
2-метилпропан-1-ол (5.4)	3,0
2-метилбутан-1-ол (5.6)	3,0
3-метилбутан-1-ол (5.7)	3,0
Етилацетат (5.8)	3,0
Бутан-1-ол (5.9)	3,0
Бутан-2-ол (5.10)	3,0
Ацеталдехид (5.11)	3,0
Ацетал (5.12)	3,0

Бележка 1: За предпочитане е ацеталът и ацеталдехидът да се прибавят последни, с цел да се сведат до минимум загубите от изпаряване.

5.14.2. Разтвор образец — Б

С помощта на пипета поставете 3 ml пентан-3-ол или друг подходящ вътрешен образец (5.5) в мерителна колба от 100 ml, съдържаща приблизително 80 ml разтвор на етанол (5.13), добавете разтвор на етанол (5.13) до необходимия обем и разбъркайте добре.

Отбележете си теглото на колбата, теглото на пентан-3-ол или на другия вътрешен образец, който сте прибавили, както и общото крайно тегло на съдържанието.

5.14.3. Разтвор образец — В

С помощта на пипета поставете 1 ml разтвор А (5.14.1) и 1 ml разтвор Б (5.14.2) в мерителна колба, съдържаща приблизително 80 ml разтвор на етанол (5.13), добавете разтвор на етанол (5.13) до необходимия обем и разбъркайте добре.

Отбележете си теглото на колбата, теглото на всеки отделен компонент, който сте прибавили, както и общото крайно тегло на съдържанието.

5.14.4. Разтвор образец — Г

С цел да се осигури последователност на аналитичното измерване, подгответе разтвор образец за качествен контрол, като използвате предварително приготвения образец А (5.14.1). С помощта на пипета поставете 1 ml разтвор А (5.14.1) в мерителна колба от 100 ml, съдържаща приблизително 80 ml разтвор на етанол (5.13), добавете разтвор на етанол (5.13) до необходимия обем и разбъркайте добре.

Отбележете си теглото на колбата, теглото на всеки отделен компонент, който сте прибавили, както и общото крайно тегло на съдържанието.

5.14.5. Разтвор образец — Д

С помощта на пипета поставете 10 ml разтвор Б (5.14.2) в мерителна колба от 100 ml, съдържаща приблизително 80 ml разтвор на етанол (5.13), добавете разтвор на етанол (5.13) до необходимия обем и разбъркайте добре.

Отбележете си теглото на колбата, теглото на всеки отделен компонент, който сте прибавили, както и общото крайно тегло на съдържанието.

5.14.6. Разтвор образец — Е

▼B

Като използвате отделни мерителни колби от по 100 ml, съдържащи приблизително 80 ml разтвор на етанол (5.13), налейте с пипета 0; 0,1; 0,5; 1,0 и 2,0 разтвор А (5.14.1) и 1 ml разтвор Б (5.14.2), добавете разтвор на етанол (5.13) до необходимия обем и разбъркайте добре.

Отбележете си теглото на колбата, теглото на всеки отделен компонент, който сте прибавили, както и общото крайно тегло на съдържанието.

5.14.7. Разтвор образец QC

С помощта на пипета поставете 9 ml разтвор образец Г (5.14.4) и 1 ml разтвор образец Д (5.14.5) в теглилка и разбъркайте добре.

Отбележете си теглото на колбата, теглото на всеки отделен компонент, който сте прибавили, както и общото крайно тегло на съдържанието.

6. **Апаратура и оборудване**

6.1. Апарат, който може да измерва плътността и алкохолното съдържание.

6.2. Аналитични везни, с които се измерва до четвъртия знак след десетичната запетая.

6.3. Газов хроматограф с програмирана температура, снабден с газов йонизиращ сигнализатор и с интегратор или друга система за обработване на данни с цел измерване на върховите показания.

6.4. Колони за газовия хроматограф, които могат да отделят аналитите по такъв начин, че минималната разделителна способност между отделните компоненти (различни от 2-метилбутан-1-ол и 3-метилбутан-1-ол) е най-малко 1.3.

Бележка 2: Следните колони и условия на газовия хроматограф са подходящи примери:

1. Стабилизационен интервал 1 m × 0.32 mm i.d., свързан с колона CP-WAX 57 CB с размери 50 m × 0.32 mm i.d. 0.2 µm дебелина на слоя (стабилизиран полиетилен гликол), последван от колона Carbowax 400 с размери 50 m × 0.32 mm i.d. 0.2 µm дебелина на слоя. (Колоните са свързани с помощта на притискащи конектори.)

Носещ газ и налягане:	Хелий (135 kPa)
Температура на колоната:	35 °C в продължение на 17 минути, 35 до 70 °C при 12 °C/мин., оставя се 25 минути на 70 °C
Температура на инжектора:	150 °C
Температура на детектора:	250 °C
Обем на инжектора:	1 µl, деление 20 на 100:1

2. Стабилизационен интервал 1 m × 0.32 mm i.d., свързан с колона CP-WAX 57 CB с размери 50 × 0.32 mm i.d. 0.2 µm дебелина (стабилизиран полиетилен гликол). (Стабилизационният интервал е свързан с помощта на притискащ конектор.)

Носещ газ и налягане:	Хелий (65 kPa)
Температура на колоната:	35 °C в продължение на 10 минути, 35 до 110 °C при 5 °C/мин., оставя се 2 минути на 190 °C
Температура на инжектора:	260 °C

▼B

Температура на детектора:	300 °C
Обем на инжектора:	1 µl, деление 55:1

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

Температура на колоната:	65 °C в продължение на 4 минути, 65 до 140 °C при 5 °C/мин., оставя се 3 минути на 150 °C
Температура на инжектора:	65 °C
Температура на детектора:	200 °C
Обем на инжектора:	1 µl

7. **Вземане на проби.**

7.1. Лабораторна проба

При приемане се измерва алкохолното съдържание на всяка проба (6.1).

8. **Процедура (използва се при валидирания метод)**

8.1. Вземане от пробата

8.1.1. Претеглете подходяща запечатана теглилка и отбележете теглото на съда.

8.1.2. Като използвате пипета, поставете 9 ml от лабораторния образец в съда и си отбележете теглото ($M_{образец}$).

8.1.3. Прибавете 1 ml от разтвора образец Д (5.14.5) и си отбележете теглото (M_{IS}).

8.1.4. Разклатете енергично материала (най-малко 20 обръщания). Образците се съхраняват при температура, по-ниска от 5 °C преди анализа, за да се сведат до минимум всякакви загуби от изпаряване.

8.2. Контролна проба

8.2.1. Като използвате везни, измерващи четири знака след десетичната запетая, (6.2), претеглете подходяща запечатана теглилка и си отбележете теглото ѝ.

8.2.2. Като използвате пипета, поставете 9 ml от 400-милилитровия разтвор на етанол (5.13) в съда и си отбележете теглото.

8.2.3. Прибавете 1 ml от разтвора образец Д (5.14.5) и си отбележете теглото.

8.2.4. Разклатете енергично материала (най-малко 20 обръщания). Образците се съхраняват при температура, по-ниска от 5 °C преди анализа, за да се сведат до минимум всякакви загуби от изпаряване.

8.3. Предварителен тест

Инжектирайте разтвор образец В (5.14.3), за да бъдете сигурни, че всички аналити са отделени с минимална разделителна способност, равна на 1,3 (с изключение на 2-метилбутан-1-ол и 3-метилбутан-1-ол).

8.4. Калибриране

Калибрирането трябва да се провери с помощта на следната процедура. Първо се уверете дали реагирането е линеарно, като анализирате последователно, по три пъти, линеарността на всеки един от разтворите образци (5.14.6), съдържащи вътрешния образец (IS). Въз основа на върховите точки на интегратора, получени при всяко инжектиране на разтвор, изчислете съотношението R на всяка сродна съставка и нарисувайте диаграма с кривата R противоположно на коефициента на концентрация на сродната съставка по отношение на вътрешния образец (IS), C.

▼B

Трябва да се получи линейна диаграма с коефициент на съотношението най-малко 0,99.

$$R = \frac{\text{Върхова точка или област на сродната съставка}}{\text{Върхова област или връх на IS}}$$

$$C = \frac{\text{Концентрация на сродната съставка (µg/g)}}{\text{Концентрация на IS (µg/g)}}$$

8.5. Определяне

Инжектирайте разтвора образец С (5.14.3) и 2 разтвора образец QC (5.14.7). Продължете с непознати образци (приготвени съгласно 8.1 и 8.2), като вкарвате по един образец QC на всеки 10 образеца, за да осигурите стабилност на анализа. Инжектирайте по един разтвор образец В (5.14.3) след всеки пети образец.

9. **Изчисление**

Може да се използва автоматизирана система за обработка на данни, при условие че данните могат да бъдат проверени с помощта на принципите, описани в дадения по-долу метод.

Измерете и отбележете всяка върхова точка или област на сродните съставки и върховете на вътрешната мостра.

9.1. Изчисляване на фактора на реагиране

От хроматограмата на инжектирането с разтвора образец С (5.14.3) изчислете факторите на реагиране на всяка сродна съставка с помощта на уравнението (1).

$$\text{(1) Фактор на реагиране} = \frac{\text{Върхова област или връх на IS}}{\text{Върхова точка или област на сродната съставка}} \times \frac{\text{Концентр. ср. съст. (µg/g)}}{\text{Концентр. IS (µg/g)}}$$

където:

IS = вътрешен образец

Концентр. ср. съст. = концентрация на сродните съставки в разтвора С (5.14.3)

Концентр. IS = концентрация на вътрешния образец в разтвора С (5.14.3)

9.1.2. Анализ на образеца

С помощта на уравнението (2), дадено по-долу, изчислете концентрацията на всяка сродна съставка в образците.

$$\text{(2) Концентрациите на сродните съставки (µg/g)} = \frac{\text{Върхова точка или област на сродната съставка}}{\text{Върхова област или връх на IS}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{M_{ОБРАЗЕЦ}\ (g)} \times \text{Концентр. IS (µg/g)} \times RF$$

$M_{образец}$ = теглото на образеца (8.1.2);

M_{IS} = теглото на вътрешния образец (8.1.3);

Концтр. IS = концентрацията на вътрешния образец в разтвор Д (5.14.5);

RF = факторът на реагиране, изчислен с помощта на уравнение 1.

9.1.3. Анализ на разтвора образец за качествен контрол

С помощта на уравнението (3), дадено по-долу, изчислете в проценти възстановяване на целевата стойност на всяка сродна съставка в разтвора образец за качествен контрол (5.14.7):

▼B

$$(3)\ \%\ \text{възстановяване на разтвора QC} = \frac{\text{концентрация на аналита в образеца QC}}{\text{концентрация на аналита в разтвора D}} \times 100$$

Концентрацията на аналита в разтвора образец за качествен контрол се изчислява с помощта на уравнение (1) и (2), дадени по-горе.

9.2. Окончателно представяне на резултатите

Резултатите се обръщат от µ/g в g на 100 литра чист алкохол в образците с помощта на уравнение (4):

(4) Концентрацията в g на 100 l чист алкохол =

Конц. (µ/g/) × ρ × 10/(алкохолно съдържание в обемни проценти) × 1000)

където

ρ = плътността в kg/m^3.

Резултатите се дават в три значещи цифри, най-много с един знак след десетичната запетая, например 11,4 g на 100 l чист алкохол.

10. **Качествен контрол и гаранция (при валидирания метод)**

С помощта на уравнение (2) по-горе, изчислете концентрацията на всяка сродна съставка в разтворите образци за качествен контрол, приготвени съгласно процедурата, дадена в 8.1.1—8.1.4. Като използвате уравнение (3), изчислете процента на възстановяване на всяка целева стойност. Ако резултатите от анализа са в рамките на ± 10 % от теоретичните стойности на всяка сродна съставка, можете да продължите с анализа. Ако не, нещата трябва да се проучат, за да се разбере каква е причината за неточностите и да се предприемат последващи действия.

11. **Характеристики на метода (прецизност)**

Статистически резултати от между-лабораторния анализ: дадените по-долу таблици съдържат стойностите на следните съставки: етанал, етилацетат, ацетал, чист етанал, метанол, бутан-2-ол, пропан-1-ол, бутан-1-ол, 2-метилпропан-1-ол, 2-метилбутан-1-ол, 3-метилбутан-1-ол.

Следните данни бяха получени в резултат на международно проучване на изпълнението на метода, извършено в съответствие с международно приетите процедури.

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	етанал

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	28	26	27	27	28
Брой на големите различия (лаборатории)	2	4	3	3	2
Брой на приетите резултати	56	52	54	54	56
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4	28,6
				13,8 (*)	52,2 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6

▼**B**

Проби	А	Б	В	Г	Д
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Граница на повторяемостта (r) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	етилацетат

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	24	24	25	24	24
Брой на големите различия (лаборатории)	2	2	1	2	2
Брой на приетите резултати	48	48	50	48	48
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Граница на повторяемостта (r) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

▼**B**

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	ацетал

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	20	21	22	17	21
Брой на големите различия (лаборатории)	4	3	2	4	3
Брой на приетите резултати	40	42	44	34	42
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60 (*)	15,1 28,3 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Граница на повторяемостта (r) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	чист етанал

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	23	19	22	21	22
Брой на големите различия (лаборатории)	1	5	2	3	2
Брой на приетите резултати	46	38	44	42	44
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8 (*)	32,7 61,8 (*)

▼**B**

Проби	А	Б	В	Г	Д
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Граница на повторяемостта (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	метанол

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	26	27	27	28	25
Брой на големите различия (лаборатории)	4	3	3	1	4
Брой на приетите резултати	52	54	54	56	50
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Граница на повторяемостта (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

▼B

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	бутан-2-ол

Проби	А	Б	В	Г
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	21	27	29	22
Брой на големите различия (лаборатории)	4	3	1	3
Брой на приетите резултати	42	54	58	44
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Граница на повторяемостта (r) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Ром; разделяне на нивата (*).

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	пропан-1-ол

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	29	27	27	29	29
Брой на големите различия (лаборатории)	2	4	3	2	2
Брой на приетите резултати	58	54	54	58	58
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6

▼B

Проби	А	Б	В	Г	Д
Граница на повторяемостта (r) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	пропан-1-ол

Проби	А	Б	В
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	20	22	22
Брой на големите различия (лаборатории)	4	4	6
Брой на приетите резултати	40	44	44
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	0,43	0,20	0,43
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Граница на повторяемостта (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати (*).

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	2-метилпропан-1-ол

▼B

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	28	31	30	26	25
Брой на големите различия (лаборатории)	3	0	1	5	6
Брой на приетите резултати	56	62	60	52	50
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0 246,8 (*)	115,99 133,87 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Граница на повторяемостта (r) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	2-метилбутан-1-ол

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	25	26	25	27	25
Брой на големите различия (лаборатории)	3	2	3	1	2
Брой на приетите резултати	50	52	50	54	50
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2 (*)	39,5 61,5 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Граница на повторяемостта (r) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5

▼**B**

Проби	А	Б	В	Г	Д
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

Година на междулабораторното изследване	1997
Брой лаборатории	32
Брой проби	5
Аналит	3-метилбутан-1-ол

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, останали след елиминиране на големите различия в стойностите	23	23	24	27	21
Брой на големите различия (лаборатории)	5	5	4	1	6
Брой на приетите резултати	46	46	48	54	42
Средна стойност ($\bar{n}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Относително отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Граница на повторяемостта (r) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Стандартно отклонение на възпроизводимостта (S_R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Относително отклонение на възпроизводимостта (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Граница на възпроизводимостта (R) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Тип проби:
А Бренди; слепи дубликати.
Б Вишновка; слепи дубликати.
В Грапа; слепи дубликати.
Г Уиски; разделяне на нивата (*).
Д Ром; разделяне на нивата (*).

▼M1

V. АНЕТОЛ. ГАЗОВО ХРОМАТОГРАФИЧНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТРАНСАНЕТОЛ В СПИРТНИ НАПИТКИ

1. **Обхват**

Този метод е подходящ за определянето на трансанетол в подправени с анасон спиртни напитки, като се използва капилярна газова хроматография.

2. **Нормативни препратки**

ISO 3696: 1987 г. Вода за аналитични лабораторни цели — Спецификации и методи на изследване.

3. **Принцип**

Концентрацията на трансанетол в спирта се определя чрез газова хроматография (ГХ). Същото количество от вътрешен стандарт, т.е. 4-алиланизол (естрагол) в случай, че естраголът не присъства естествено в пробата, се прибавя към пробата за изследване и към трансанетолен разтвор с известна концентрация, които след това се разреждат с 45-процентов етанолов разтвор и се инжектират директно в системата ГХ. За ликьори с високо съдържание на захар е необходима екстракция преди приготвяне на пробата и анализ.

4. **Реагенти и материали**

По време на анализа трябва да се използват само реагенти с чистота най-малко 98 %. Използва се вода клас най-малко 3, съгласно дефиницията на ISO 3696.

Съответните химикали се съхраняват на хладно (при 4 °C), далече от светлина, в алуминиеви контейнери или в тъмни (кехлибарени) стъклени бутилки за реагенти. За предпочитане е запушалките да бъдат поставени с алуминиев печат. Трансанетолът ще трябва да бъде „размразен“ от своето кристално състояние преди употреба, но в този случай неговата температура никога не трябва да надвишава 35 °C.

4.1. Етанол 96 об. % (CAS 64-17-5)

4.2. 1-метокси-4-(1-пропенил) бензол; (трансанетол) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-алиланизол, (естрагол) (CAS 140-67-0), предлаган вътрешен стандарт (ВС)

4.4. Етанол 45 об. %

Прибавят се 560 g дестилирана вода към 378 г етанол 96 об. %.

4.5. Приготвяне на стандартни разтвори

Всички стандартни разтвори се съхраняват при стайна температура (15 до 35 °C) далече от светлина в ауминиеви контейнери или в тъмни (кехлибарени) стъклени бутилки за реагенти. За предпочитане е запушалките да бъдат поставени с алуминиев печат.

Трансанетолът и 4-алиланисолът са практически неразтворими във вода и следователно е необходимо да се разтворят трансанетолът и 4-алиланисолът в 96 % етанол (4.1) преди да се добави 45 % етанол (4.4).

Запасите от разтвори трябва да бъдат прясно приготвени всяка седмица.

4.5.1. Стандартен разтвор А

Запасен разтвор от трансанетол (концентрация: 2 g/l)

Претеглят се 40 mg трансанетол (4.2) в 20 ml обемна колба (400 mg в 200 ml и т.н.). Добавя се 96 об. % етанол, допълва се до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

▼M1

4.5.2. Вътрешен стандартен разтвор Б

Запасен разтвор от вътрешен стандарт, т.е. естрагол (концентрация: 2 g/l)

Претеглят се 40 mg естрагол (4.3) в 20-милилитрова колба (400 mg в 200 ml и т.н.). Добавя се 96 об. % етанол, допълва се до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

4.5.3. Разтвори, използвани за проверка на линейните показания на детектора за йонизация на пламъка (ДИП)

Линейните показания на ДИП трябва да бъдат проверени за анализа, взимайки предвид диапазон от концентрации на транс-анетол в спирта от 0 g/l до 2.5 g/l. В процеса на анализиране неизвестните проби на спиртове, които ще се анализират, се разреждат 10 пъти (8.3). За условията на анализа, описан в метода, запасните разтвори, съответстващи на концентрации 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 и 0.25 g/l на транс-анетол в пробата, която ще се анализира, се приготвят както следва: взима се по 0.5, 1, 1.5, 2 и 2.5 мл запасен разтвор А (4.5.1) и се капва в отделни 20-милилитрови колби; капва се във всяка колба 2 ml от вътрешния стандартен разтвор Б (4.5.2) и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

Чистите разтвори (8.4) се използват като 0 g/l разтвор.

4.5.4. Стандартен разтвор В

Взимат се 2 ml стандартен разтвор А (4.5.1) и се капва в 20-милилитрова колба, след това се прибавят 2 ml вътрешен стандартен разтвор Б (4.5.2) и се допълва да обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

5. **Апаратура и оборудване**

5.1. Капилярен газов хроматограф, поставен с детектор за йонизация на пламъка (ДИП) и интегратор или друга управляваща данните система, способна да измерва височини или повърхности на максимумите и с автоматичен пробатор, или необходимото оборудване за ръчно инжектиране на проби.

5.2. Разделящ/неразделящ инжектор

5.3. Капилярна колона, например:

Дължина: 50 m

Вътрешен диаметър: 0.32 mm

Плътност на филма: 0.2 μm

Стационарна фаза: FFAP — модифициран TPA полиетилен гликол порест полимер с напречни връзки.

5.4. Общо лабораторно оборудване: градуирана обемна стъклария, аналитична везна (точност: ± 0.1 mg).

6. **Хроматографски условия**

Видът и размерите на колоните и условията на ГХ трябва да бъдат такива, че анетолът и вътрешният стандарт да са отделени един от друг и от всякакви външни вещества. Типичните условия за колоната, дадена за пример в 5.3 са:

6.1. Преносим газ: аналитичен хелий

6.2. Скорост на потока: 2 ml/min.

6.3. Температура на инжектора: 250 °C

6.4. Температура на детектора: 250 °C

6.5. Температурни условия на пещта: изотермична, 180 °C, период на експлоатация 10 min.

6.6. Инжекционен обем: 1 μl, разделяне 1:40.

▼M1

7. **Проби**

Пробите се съхраняват при стайна температура, на тъмно и на хладно.

8. **Процедура**

8.1. Наблюдение на пробите за естрагол

За да е сигурно, че естраголът не присъства естествено в пробата, трябва да бъде извършен пълен анализ без да се добавя никакъв вътрешен стандарт. В случай, че естраголът присъства естествено в пробата, трябва да бъде избран друг вътрешен стандарт (например ментол).

Капват се 2 ml проба в 20-милилитрова колба и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

8.2. Приготвяне на неизвестни проби

Капват се 2 ml проба в 20-милилитрова колба, след това се прибавя 2 ml вътрешен стандартен разтвор Б (4.5.2) и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

8.3. Бланков разтвор

Капват се 2 ml вътрешен стандартен разтвор Б (4.5.2) в 20-милилитрова колба и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

8.4. Линеен тест

Преди започване на анализа, линейността на показанията на ДИП се проверява чрез трикратно последователно анализиране на всеки от линейните стандартни разтвори (4.5.3).

Интегрираните повърхности или височини на максимумите за всяка инжекция образуват графика на концентрацията на техния базов разтвор в g/l спрямо отношението R за всяка една.

R = височина или повърхност на максимума на трансанетола, разделена на височината или повърхността на максимума на естрагола.

Получава се линейна графика.

8.5. Определяне

Инжектира се бланковият разтвор (8.3), след това стандартен разтвор В (4.5.4), последван от един от линейните стандарти (4.5.3), който ще служи като проба за качествен контрол (тя може да бъде избрана като се има предвид вероятната концентрация на трансанетол в неизвестната), след това пет неизвестни (8.2); вкарва се линейна (за контрол на качеството) проба след всеки пет неизвестни проби, за да се осигури аналитична стабилност.

9. **Изчисляване на коефициента на отговор**

Измерват се както повърхностите на максимум (като се използва интегратор или друга система за данни) или височините на максимума (ръчна интеграция) за трансанетол, така и вътрешни стандартни максимуми.

9.1. Изчисляване на коефициента на отговор (RF_i)

Коефициентът на отговор се изчислява по следния начин:

$RF_i = (C_i/\text{повърхност или височина}_i)*(\text{повърхност или височина}_{is}/C_{is})$

където:

C_i е концентрацията на трансанетол в стандартния разтвор А (4.5.1)

C_{is} е концентрацията на вътрешен стандарт в стандартния

▼M1

разтвор Б (4.5.2)

област$_i$ е повърхността (или височината) на максимума на трансанетола

област$_{is}$ е повърхността (или височината) на максимума на вътрешния стандарт

RF_i се изчислява от петте проби на разтвора В (4.5.4).

9.2. Анализ на тестовите разтвори за линейни показания

Инжектира се тестов разтвор за линейни показания (4.5.3)

9.3. Анализ на пробата

Инжектира се неизвестен пробен разтвор (8.2).

10. **Изчисляване на резултати**

Формулата за изчисляване на концентрацията на трансанетола е следната:

$c_i = C_{is} * (\text{повърхност или височина}_i/\text{повърхност или височина}_{is}) * RF_i$

където:

c_i е неизвестната концентрация на трансанетол

C_{is} е концентрацията на вътрешния стандарт в неизвестната (4.5.2)

повърхност или височина$_i$ е повърхността или височината на максимума на трансанетола

повърхност или височина$_{is}$ е повърхността или височината на максимума на вътрешния стандарт

RF_i е коефициентът на отговор (изчислен както в 9.1)

Концентрацията на трансанетол се изразява в грамове на литър, до един десетичен знак.

11. **Осигуряване на качество и контрол**

Хроматограмите трябва да бъдат такива, че анетолът и вътрешният стандарт да са отделени един от друг и от всякакви външни вещества. Стойността на RF_i се изчислява от резултатите за петте инжекции на разтвор В (4.5.4). В случай, че коефициентът на изменение (CV % = (стандартно отклонение/средно)*100) е в рамките на плюс или минус 1 %, средната стойност на RF_i е приемлива.

Посоченото по-горе изчисление се използва за изчисляване на концентрацията на трансанетол в пробата, избрана за контрол на качеството от линейните контролни разтвори (4.5.3).

В случай, че изчислените средни резултати от анализ на линейния разтвор, избран за проба за вътрешен контрол на качеството (ВКК) са в рамките на плюс или минус 2,5 % от тяхната теоретична стойност, тогава резултатите за неизвестните проби могат да се приемат.

12. **Обработка на спиртна проба, съдържаща голямо количество захар и на ликьорна проба преди ГХ анализ**

Извличане на алкохол от спиртна напитка, съдържаща голямо количество захар, за да може да се определи концентрацията на трансанетол, като се използва капилярна газова хроматография.

12.1. Принцип

Взима се кратна на ликьоровата проба и към нея се прибавя вътрешния стандарт, при концентрация, близка до тази на аналита (трансанетола) в ликьора. Към това се прибавя натриев

▼M1

фосфат додекахидрат и амониев сулфат без кристализационна вода. Получената смес се разбива добре и се охлажда до получаване на два пласта и горният алкохолен пласт се отстранява. Аликвотна част от този алкохолен пласт се взима и се разрежда с 45 % етанолов разтвор (4.4) (Забележка: на този етап не се добавя вътрешен стандарт, тъй като вече е бил добавен). Полученият разтвор се анализира в газова хроматография.

12.2. Реагенти и материали

По време на екстракцията се използват само реагенти с чистота по-голяма от 99 %.

12.2.1. Амониев сулфат, едноводен, (CAS 7783-20-2).

12.2.2. Натриев фосфат, двуосновен, додекахидрат, (CAS 10039-32-4).

12.3. Апаратура и оборудване

Конусообразни колби, разделителни колби, хладилник.

12.4. Процедура

12.4.1. Наблюдение на пробата за естрагол

За да се осигури естраголът да не присъства естествено в пробата, пълна екстракция (12.6.2) и анализ трябва да бъдат извършени без прибавянето на никакъв вътрешен стандарт. В случай, че естраголът присъства естествено в пробата, трябва да бъде избран друг вътрешен стандарт.

12.4.2. Екстракция

Капват се 5 ml от 96 % етанол (4.1) в конусообразна колба, добавят се 50 mg вътрешен стандарт (4.3) и се прибавят 50 ml от пробата. Прибавят се 12 g амониев сулфат, едноводен (12.2.1) и 8.6 g двуосновен натриев фосфат, додекахидрат (12.2.2). Конусообразната колба се запушва.

Колбата се разклаща в продължение най-малко на 30 минути. Може да се използва механично устройство за разклащане, но не и покрита с тефлон магнитна разбъркваща пръчка, тъй като тефлонът ще абсорбира част от аналита. Трябва да се отбележи, че прибавените соли няма да се разтворят напълно.

Запушената колба се поставя в хладилник ($T < 5$ °C) най-малко за два часа.

След този период трябва да има два различни течни слоя и твърда утайка. Алкохолният слой трябва да бъде чист; в случай, че не е, се поставя отново в хладилника докато се отдели чист.

В случай, че алкохолният пласт е чист, внимателно се взима аликвотна част (т.е. 10 ml), без да се нарушава водният пласт, поставя се в кехлибарен съд и плътно се затваря.

12.4.3. Приготвяне на извлечената проба за анализ

Оставя се екстрактът (12.4.2) да достигне стайна температура.

Взимат се 2 ml от алкохолния пласт на извлечената проба с умерена температура и се капват в 20-милилитрова колба, допълва се до обем с 45 % етанол (4.4), разбърква се добре.

12.5. Определяне

Следва се процедурата, описана в 8.5.

12.6. Изчисляване на резултати

За изчисляване на резултатите се използва следната формула:

$$C_i = (m_{is}/V) * (\text{повърхност}_i/\text{повърхност}_{is}) * RF_i$$

▼**M1**

Където:

m_{is}	е масата на вътрешния стандарт (4.3), който е взет (12.4.2) (в милиграми)
V	е обемът на неизвестна проба (50 ml)
RF_i	е коефициентът на отговор (9.1)
повърхност$_i$	е повърхността на максимум на трансанетол
повърхност$_{is}$	е повърхността на максимум на вътрешен стандарт

Резултатите се изразяват в грамове на литър, до един десетичен знак.

12.7. Качествен контрол и сигурност

Следва се процедурата, описана в точка 11 по-горе.

13. **Характеристики на работа на метода (точност)**

Статистически резултати от вътрешнолабораторен тест:

следващите таблици дават стойностите за анетола.

Следващите данни са получени от международно изучаване на работата на метода, направено съобразно международно съгласувани процедури.

Година на вътрешнолабораторния тест	1998
Брой на лабораториите	16
Брой на пробите	10
Аналит	анетол

Pastis:

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	15	15	15	13	16	16
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	1	1	1	3	—	—
Брой на приетите резултати	30	30	30	26	16	16
Средна стойност g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Стандартно отклонение на повтаряемост (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Относително стандартно отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Лимит на повторяемост (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Стандартно отклонение на възпроизвеждане (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Относително стандартно отклонение на възпроизвеждане (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Лимит на възпроизвеждане (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Видове проби:

А pastis, еднакви дубликати

Б pastis, еднакви дубликати

▼**M1**

В pastis, еднакви дубликати

Г pastis, еднакви дубликати

Д pastis, единични дубликати

Е pastis, единични дубликати

Други спиртни напитки с анасон:

Проби	Ж	З	И	Й
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	16	14	14	14
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	—	2	1	1
Брой на приетите резултати	32	28	28	28
Средна стойност g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Относително стандартно отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Лимит на повторяемост (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Стандартно отклонение на възпроизвеждане (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Относително стандартно отклонение на възпроизвеждане (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Лимит на възпроизвеждане (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Видове проби:

Ж ouzo, нива на разделяне (*)

З anis, еднакви дубликати

И ликьор с анасон, дубликати

Й ликьор с анасон, дубликати.

▼M1

VI. ГЛИЦИРИЗИНОВА КИСЕЛИНА. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЛИЦИРИЗИНОВА КИСЕЛИНА ЧРЕЗ ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. **Обхват**

Този метод е подходящ за определянето на глицеризиновата киселина в спиртни напитки с анасон, като се използва високоефективна течна хроматография (ВЕТХ). Съгласно Регламент (ЕИО) № 1576/89 всеки подправен с анасон спирт, който се нарича „pastis“, трябва да съдържа от 0,05 до 0,5 g глицеризинова киселина на литър.

2. **Нормативни препратки**

ISO 3696: 1987 г. Вода за аналитични лабораторни цели — Спецификации и методи на изследване.

3. **Принцип**

Концентрацията на глицеризинова киселина се определя като се използва високоефективна течна хроматография (ВЕТХ) с UV детекция. Стандартен разтвор и пробата за тестване се филтрират и се инжектират поотделно директно в системата ВЕТХ.

4. **Реагенти и материали**

По време на анализа се използват само реагенти от степен ВЕТХ, чист етанол и вода от степен 3, както е дефинирано от ISO 3696.

4.1. Етанол 96 об. % (CAS 64-17-5).

4.2. Амониев глициризинат, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (глициризинова киселина амониева сол)

(Mol. Wt.: 839,98)(CAS 53956-04-0): чистота най-малко 90 %

(Mol. Wt.: глицеризинова киселина 822,94).

4.3. Оцетна киселина на кристали, CH_3COOH, (CAS 64-19-7).

4.4. Метанол, CH_3OH (CAS 67-56-1).

4.5. Етанол 50 об. %

За 1 000 ml при 20 °C:

— 96 об. % етанол (4.1): 521 ml

— вода (2.0): 511 ml.

4.6. Приготвяне на ВЕТХ разтвори за отстраняване на вещества

4.6.1. Разтворител за отстраняване А (пример)

80 части (от обема) вода (2.0)

20 части (от обема) оцетна киселина (4.3).

Разтворителят за отстраняване се обезгазява за пет минути.

Забележка: В случай, че водата, която се използва, не е била микрофилтрирана, е препоръчително да се филтрира приготвеният разтворител за отстраняване чрез филтър за органични разтворители с размер на порите по-малък или равен на 0.45 μm.

4.6.2. Разтворител за отстраняване Б

Метанол (4.4).

4.7. Приготвяне на стандартни разтвори

Всички стандартни разтвори трябва да бъдат прясно приготвени след два месеца.

▼M1

4.7.1. Референтен разтвор B

Претеглят се с точност до 0,1 mg, 25 mg амониев глицеризинат (4.2) в 100-милилитрова колба. Прибавя се малко 50 об. % етанол и се разтваря амониевият глицеризинат. След като се е разтворил, се допълва до отбелязаното с 50 об. % етанол (4.5).

Филтрира се през филтър за органични разтворители.

4.7.2. Стандартни разтвори, които се използват за проверка на линейността на показанията на инструментите

Запасен разтвор 1,0 g/l се приготвя чрез претегляне с точност до 0,1 mg на 100 mg амониев глицеризинат в 100-милилитрова колба. Прибавя се малко 50 об. % етанол (4.5) и се разтваря амониевият глицеризинат. След като се е разтворил, се допълва до отбелязаното с 50 об. % етанол (4.5).

Най-малко четири други разтвора, съответстващи на 0,05, 0,1, 0,25 и 0,5 g/l амониев глицеризинат се приготвят като се капнат съответно 5 ml, 10 ml, 25 ml и 50 ml от запасния разтвор 1,0 g/l в отделни 100-милилитрови колби. След това се допълва до отбелязаното с 50 об. % етанол (4.5) и се разбърква добре.

Всички разтвори се филтрират през филтър за органични разтворители.

5. **Апаратура и оборудване**

5.1. Система за отделяне

5.1.1. Високоефективен течен хроматограф.

5.1.2. Изпомпваща система, позволяваща да се достигне и поддържа постоянна или програмирана скорост на потока с голяма точност.

5.1.3. Система за UV спектрофотометрична детекция: да бъде поставена на 254 nm.

5.1.4. Система за обезгазяване на разтворителя.

5.2. Изчислителен интегратор или записващо устройство, работата на което е съвместима с останалата част на системата.

5.3. Колона (пример):

Материал: неръждаема стомана или стъкло

Вътрешен диаметър: от 4 до 5 mm

Дължина: от 100 до 250 mm

Стационарна фаза: силицев двуокис с напречни връзки с (за предпочитане сферична) октадецил функционална група (C18), максимален размер на частиците: 5 μm.

5.4. Лабораторно оборудване

5.4.1. Аналитична везна с точност 0,1 mg

5.4.2. Стъклария с обем A-клас

5.4.3. Микромембранна филтрация за малки обеми.

6. **Хроматографски условия**

6.1. Характеристики на разтвора за отстраняване на абсорбираните вещества: (пример)

— скорост на потока: 1 ml/min,

— разтворител A = 30 %,

— разтворител Б = 70 %.

6.2. Детекция:

— UV = 254 nm

▼M1

7. **Процедура**

7.1. Приготвяне на спиртната проба

Да се филтрира при необходимост чрез филтър за органични разтворители (диаметър на порите: 0.45 μm).

7.2. Определяне

След като се установят хроматографичните условия,

— се инжектират 20 μl референтен разтвор B (4.7.1.),

— се инжектират 20 μl от пробния разтвор,

— сравняват се двете хроматограми. Определят се максимумите на глицеризиновата киселина от тяхното време на задържане. Измерват се техните повърхности (или височини) и се изчислява концентрацията в g/l до втория десетичен знак, като се използва следното равенство:

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

Където:

c е концентрацията в грамове за литър на глицеризиновата киселина в спирта, който се анализира

C е концентрацията в грамове за литър на амониевия глицеризинат в референтния разтвор

h е повърхността (или височината) на максимума на глицеризиновата киселина на спирта, който се анализира

H е повърхността (или височината) на максимума на глицеризиновата киселина на референтния разтвор

P е чистотата на референтния амониев глицеризинат (в %)

823 е масата на един мол глицеризинова киселина

840 е масата на един мол амониев глицеризинат

8. **Характеристики на работа на метода (точност)**

Статистически резултати от вътрешнолабораторния тест:

стойностите за глицеризиновата киселина са дадени в следната таблица.

Следните данни са получени от международно изследване на действието на метода, извършено в съответствие с международно съгласувани процедури.

Година на вътрешнолабораторния тест	1998
Брой на лабораториите	16
Брой на пробите	5
Аналит	глициризинова киселина

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	13	14	15	16	16
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	3	2	1	—	—
Брой на приетите резултати	26	28	30	32	32

▼**M1**

Проби	А	Б	В	Г	Д
Средна стойност g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Стандартно отклонение на повторяемост (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Относително стандартно отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Лимит на повторяемост (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Стандартно отклонение на възпроизвеждане (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Относително стандартно отклонение на възпроизвеждане (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Лимит на възпроизвеждане (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Видове проби:

А pastis, еднакви дубликати

Б pastis, нива на разцепване (*)

В pastis, еднакви дубликати

Г pastis, еднакви дубликати

Д pastis, еднакви дубликати

▼M1

VII. ХАЛКОНИ. ВИСОКОЕФЕКТИВЕН МЕТОД НА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ ЗА УСТАНОВЯВАНЕ НАЛИЧИЕТО НА ХАЛКОНИ В PASTIS

1. **Обхват**

Този метод е подходящ за определяне на наличието или отсъствието на халкони в напитки, подправени с анасон. Халконите са естествени оцветители от рода на флавона, които се съдържат в корена на сладника (*Glycyrrhiza glabra*).

За да се нарече една подправена с анасон напитка „pastis“, тя трябва да съдържа *chalcone* (Регламент (ЕИО) № 1576/89).

2. **Нормативни препратки**

ISO 3696: 1987 г. Вода за аналитични лабораторни цели — Спецификации и методи на изследване.

3. **Принцип**

Приготвя се разтвор на референтен екстракт от сладник. Наличието или отсъствието на халкони се определя като се използва високоефективна течна хроматография (BETX) с UV детекция.

4. **Реагенти и материали**

По време на анализа се използват само реагенти от степен BETX. Етанолът трябва да бъде 96 об. %. Само вода със степен 3, както е определено от ISO 3696, трябва да се използва.

4.1. Етанол 96 об. % (CAS 64-17-5)

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

4.3. Референтно вещество: *Glycyrrhiza glabra*: сладник, „сладък корен“

Грубо смлени корени от сладник (*Glycyrrhiza glabra*). Средни размери на пръчковидните частици: дължина: от 10 до 15 mm, дебелина: от 1 до 3 mm.

4.4. Натриев ацетат, CH_3COONa, (CAS 127-09-3)

4.5. Оцетна киселина на кристали, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.6. Приготвяне на разтвори

4.6.1. Етанол 50 об. %

За 1 000 ml при 20 °C:

— 96 об. % етанол (4.1.): 521 ml,

— вода (2.0): 511 ml.

4.6.2. Разтворител А: ацетонирил

Ацетонирил (4.2.) с BETX аналитична чистота.

Обезгазява се.

4.6.3. Разтворител Б: 0,1 M буферен разтвор на натриев ацетат, pH 4,66.

Претеглят се 8,203 g натриев ацетат (4.4), добавят се 6,005 g кристализирала оцетна киселина (4.5) и се допълва до 1 000 ml с вода (2) в обемна колба.

5. **Приготвяне на референтния екстракт от *Glycyrrhiza glabra* (4.3)**

5.1. Претеглят се 10 g смлян корен от сладник (*Glycyrrhiza glabra)* (4.3) и се поставят в дестилационна колба с обло дъно

— добавят се 100 ml 50 об. % етанол (4.6.1),

— вари се на водна баня един час,

— филтрира се,

▼M1

— филтратът се оставя настрани за по-късна употреба.

5.2. Извлича се екстрактът от сладник от филтъра

— поставя се в дестилационна колба с обло дъно,

— добавят се 100 ml от 50 об. % етанол (4.6.1),

— вари се на водна баня един час,

— филтрира се. Филтратът се оставя настрани за по-късна употреба.

5.3. Екстракцията на корен от сладник трябва да бъде извършена три пъти последователно.

5.4. Трите филтрата се смесват.

5.5. Изпарява се разтворителят (от 5.4.) върху ротативен изпарител.

5.6. Улавя се остатъчният екстракт (от 5.5) със 100 ml 50 об. % етанол (4.6.1).

6. **Апаратура и оборудване**

6.1. Сепарационна система.

6.1.1. Високоефективен течен хроматограф.

6.1.2. Помпена система, която може да достигне и поддържа постоянна или зададена скорост на потока при високо налягане.

6.1.3. UV/видима спектрофотометрична детекционна система, която може да бъде поставена на 254 и 370 nm.

6.1.4. Система за обезгазяване на разтворителя:

6.1.5. Колонна пещ, която може да работи при температура 40 ± 0,1 °C.

6.2. Изчислителен интегратор или рекордер, който е съвместим с останалата част на сепарационната система.

6.3. Колона

Материал: неръждаема стомана или стъкло

Вътрешен диаметър: от 4 до 5 mm

Постоянна съставка: кварц с напречни връзки с функционална група (C18), производна на октадецила, размер на частиците: 5 μm най-много (съставка с напречни връзки).

6.4. Общо лабораторно оборудване, включително:

6.4.1. аналитична везна. (точност: ± 0,1 mg);

6.4.2. дестилационна апаратура с хладник на водната баня, включващ например:

— 250-милилитрова колба с обло дъно със стандартизирана стъклена поставка,

— 30 cm дълъг хладник на водната баня и

— източник на топлина (всяка пирогенна реакция, включваща извличащо вещество задължително трябва да бъде избегната чрез използването на подходяща подредба).

6.4.3. Ротативна апаратура за изпаряване.

6.4.4. Задаване на филтрация (т.е. фуния на Buchner).

6.5. Условия на хроматография (пример).

6.5.1. Характеристики на отстраняване на абсорбирания материал чрез разтворител А (4.6.2) и Б (4.6.3):

— превключва се от 20/80 (v/v) до 50/50 (v/v) градиент за 15 минути,

— превключва се от 50/50 (v/v) до 75/25 (v/v) градиент за пет минути,

— еднаква мощност при 75/25 (v/v) за пет минути,

▼M1

— стабилизация на колоната между инжекциите,

— еднаква мощност при 20/80 (v/v) за пет минути.

6.5.2. Скорост на потока: 1 ml/min.

6.5.3. Настройка на UV детектора:

детекторът трябва да бъде поставен на 370 nm, за да детектира наличието на халкони и след това на 254 nm, за да детектира глицеризинова киселина.

Забележка: промяната на дължината на вълната (от 370 nm до 254 nm) трябва да бъде извършена 30 секунди преди началото на максимума на отстраняването на глицгризинова киселина.

7. **Процедура**

7.1 Приготвяне на спиртната проба

Филтрира се чрез филтър за органични разтвори (диаметър на порите: 0,45 μm).

7.2. Приготвяне на остатъчния екстракт от сладник (5.6)

Прави се разтвор едно към десет с 50 об. % етанол (4.6.1) преди анализа.

7.3. Определяне

7.3.1. Инжектират се 20 μl от приготвения екстракт от сладник (7.2). Анализът се извършва като се използват условията на хроматография, описани по-горе (6.5).

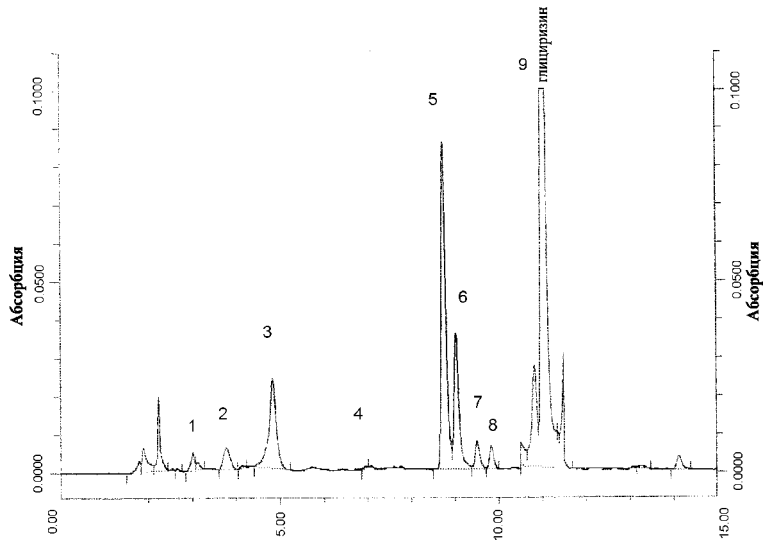
7.3.2. Инжектират се 20 μl от пробата (7.1) (спиртна проба, подправена с анасон). Анализът се извършва като се използват условията на хроматография, описани по-горе (6.5).

7.3.3. Сравняват се двете хроматограми. Двете хроматограми трябва да бъдат много сходни в халконовата изходна зона (по време на детекцията при 370 nm при условията на анализ, описани по-горе) (виж фиг. 1).

8. **Хроматограма на характеристиките на pastis**

Фигура 1

Хроматограма, получена чрез метода, описан по-горе, показваща присъствието на халкони в „pastis“. Максимумите от 1 до 8 са халкони, а максимум 9 е глицеризинова киселина.



▼M1

9. **Характеристики на работа на метода (точност)**

Резултати от вътрешнолабораторния тест:

следната таблица представя работата за установяване наличието или отсъствието на халкони в pastis и напитки, подправени с анасон.

Следващите данни са получени от международно изследване на работата на метода, направено съобразно международно съгласувани процедури.

Година на вътрешнолабораторния тест	1998
Брой на лабораториите	14
Брой на пробите	11
Аналит	халкони

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	14	14	14	14	14	13
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	—	—	—	—	—	1 (*)
Брой на приетите резултати	28	14	14	28	28	26
Брой на резултатите, показващи наличие на халкони	28	14	14	0	28	0
Брой на резултатите, показващи отсъствие на халкони	0	0	0	28	0	26
Процент на точните резултати (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Противоречиви резултати между двата дубликата, дължащи се на пробна грешка

Проби	Ж	З	И	Й	К
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	14	14	14	14	14
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	—	—	—	—	—
Брой на приетите резултати	28	14	14	28	28
Брой на резултатите, показващи наличие на халкони	0	0	0	0	0
Брой на резултатите, показващи отсъствие на халкони	28	14	14	28	28
Процент на точните резултати (%)	100	100	100	100	100

Видове проби:

А pastis, еднакви дубликати

Б pastis, единична проба

В pastis, единична проба

Г „pastis“ (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

Д „pastis“ (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

Е ликьор, подправен с анасон (несъдържащ халкони), еднакви

▼**M1**

дубликати

Ж ликьор, подправен с анасон (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

З ouzo (несъдържащо халкони), единична проба

И ouzo (несъдържащо халкони), единична проба

Й anis (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

К „pastis“ (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

▼M1

IX. ЯЙЧЕН ЖЪЛТЪК. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА ЯЙЧЕН ЖЪЛТЪК В СПИРТНИ НАПИТКИ — ФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД

1. **Обхват**

Този метод е подходящ за определянето на концентрацията на яйчен жълтък в границите от 40 до 250 g/l в яйчен ликьор и ликьор с яйце.

2. **Нормативни препратки**

ISO 3696: 1987 г. Вода за аналитични лабораторни цели — Спецификации и методи на изследване.

3. **Принцип**

Разтворимите в етанол фосфорни съединения, открити в яйчен жълтък, са извлечени и анализирани фотометрично като комплекс на фосфора и сол на молибденовата киселина.

4. **Реагенти и материали**

4.1. Двойно дестилирана вода

4.2. Диатомит

4.3. Етанол 96 об. % (CAS 64-17-5)

4.4. 15 % разтвор на магнезиев ацетат (CAS 16674-78-5)

4.5. 10 % сярна киселина (CAS 7664-93-9)

4.6. 1 N сярна киселина.

4.7. 0,16 g/l разтвор на калиев дихидроген фосфат (CAS 778-77-0), KH_2PO_4

4.8. Реагент за определяне на фосфата:

разтварят се 29 g амониева сол на молибденовата киселина (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ в 400 ml вода при 50 °C;

разтваря се в друг съд 1 g амониев ванадит (CAS 7803-55-6), (NH_4VO_3 в 300 ml гореща вода, оставя се да изстине, след това се добавят 140 ml концентрирана азотна киселина (CAS 7697-37-2). Охладените разтвори се смесват в 1 000-милилитрова колба и се допълват до 1 000 ml.

5. **Апаратура и оборудване**

5.1. 100 ml конична колба

5.2. Ултразвукова вана (или магнитна бъркалка)

5.3. 100-милилитрова колба

5.4. 20 °C водна баня

5.5. Филтър (Whatman № 4 или еквивалентен)

5.6. Порцеланов (или платинен) тигел

5.7. Вана с вряща вода

5.8. Гореща плоча

5.9. Муфелна пещ

5.10. 50-милилитрова колба

5.11. 20-милилитрова колба

5.12. Спектрометър, поставен на 420 nm

5.13. 1-сантиметрова епруветка.

6. **Проби**

Пробите се съхраняват преди анализ при стайна температура.

▼M1

7. **Процедура**

7.1. Приготвяне на пробата

7.1.1. Претеглят се 10 g проба в 100-милилитрова конична колба (5.1).

7.1.2. Добавят се постепенно 70 ml етанол (4.3) на малки порции, като се разбърква при всяко добавяне и се поставя в ултразвукова вана (5.2) за 15 минути (или сместа се разбърква с магнитна бъркалка (5.2) за 10 минути при стайна температура).

7.1.3. Съдържанието на колбата се прехвърля в 100-милилитрова колба (5.3) с измиване на етанола (4.3). Наглася се до калибровъчния знак с етанол (4.3) и колбите се поставят в 20 °C водна баня (5.4). Наглася се до калибровъчния знак на 20 °C.

7.1.4. Добавя се малко диатомит (4.2) и се филтрира (5.5), като първите 20 ml се изхвърлят.

7.1.5. 25 ml от филтрата се прехвърлят в порцеланов (или платинен) тигел (5.6). Филтратът трябва след това да бъде концентриран чрез леко изпаряване във вана с вряща вода (5.7), като се добави 5 ml 15 % разтвор на магнезиев ацетат (4.4).

7.1.6. Тигелите се поставят върху гореща плоча (5.8) и се нагряват до изсушаване.

7.1.7. Остатъкът се изгаря до пепел, като се нагрява до нажежаване до бяло при 600 °C в муфелна пещ (5.9) докато пепелта стане бяла, най-малко един час и половина, но може да се остави и една нощ.

7.1.8. Пепелта се улавя с 10 ml 10 % сярна киселина (4.5) и се прехвърля с измиване с дестилирана вода (4.1) в 50-милилитрова колба (5.10) и се напълва до знака при стайна температура с дестилирана вода (4.1). 5 ml аликвотна част на този разтвор от пепел ще се използва за приготвяне на пробния разтвор на фотометричния анализ на фосфата.

7.2. Фотометричен анализ на фосфата

7.2.1. Разтвор за сравнение

7.2.1.1. Поставят се 10 ml 10 % сярна киселина (4.5) в 50-милилитрова колба (5.10) и се допълва до означението с дестилирана вода (4.1).

7.2.1.2. Към 5 мл аликвотна част от този разтвор (7.2.1.1), съдържаща се в 20-милилитрова колба (5.11), се добавя 1 ml 1 N сярна киселина (4.6) и 2 мл от фосфатния реагент (4.8) и се допълва до 20 ml с дестилирана вода (4.1).

7.2.1.3. Запушва се с хлабава запушалка, разклаща се и се нагрява във вана с вряща вода (5.7) за 10 минути, след това се охлажда в 20 °C водна баня (5.4) за 20 минути.

7.2.1.4. Епруветка 1 cm (5.13) се напълва с този разтвор за сравнение.

7.2.2. Пробен разтвор

7.2.2.1. Към 5 ml кратен на разтвора от пепел (7.1.8), съдържащ се в 20-милилитрова колба (5.11), се добавя 1 ml 1 N сярна киселина (4.6) и 2 ml от фосфатния реагент (4.8) и се допълва до 20 ml с дестилирана вода (4.1).

7.2.2.2. Запушва се с хлабава запушалка, разклаща се и се нагрява във вана с вряща вода (5.7) за 10 минути, след това се охлажда в 20 °C водна баня (5.4) за 20 минути.

7.2.2.3. Жълтият разтвор, който се получава, незабавно се анализира спектрофотометрично (5.12) в 1-сантиметрова епруветка (5.13) при 420 nm спрямо разтвора за сравнение (7.2.1.4).

7.2.3. Калибрационна крива

7.2.3.1. За да се построи калибрационната крива се добавя 2 ml аликвотна част от фосфатния реагент (4.8) към 20-милилитрови колби (5.11), всяка от които съдържа 1 ml от 1 N сярна киселина (4.6) и 0, 2, 4, 6, 8 и 10 ml разтвор на калиев дихидроген фосфат (4.7) съответно и се допълва до означението 20 ml с дестилирана вода (4.1).

▼M1

7.2.3.2. Запушва се с хлабава запушалка, разклаща се и се нагрява във вана с вряща вода (5.7) за 10 минути, след това се охлажда в 20 °C водна баня (5.4) за 20 минути и се анализира спектрофотометрично (5.12) в 1-сантиметрова епруветка (5.13) при 420 nm спрямо разтвора за сравнение (7.2.1.4).

7.2.3.3. Построяване на калибрационната крива:

разтвор на дихидроген фосфат (ml)	0	2	4	6	8	10
P_2O_5 (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. **Изразяване на резултати**

Съдържанието на яйчен жълтък в g/l се изчислява по следната формула:

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

където:

110	коефициент на конверсия за общо P_2O_5 в g в 100 g яйчен жълтък
mg P_2O_5	стойност, установена от калибрационната крива
плътност	маса за единица обем (g/ml) на ликьор на яйчна основа при 20 °C
E	тегло на ликьора на яйчна основа в g
40	коефициент на разтваряне за 5 ml аликвотна част на разтвор на пепел.

9. **Характеристики на работа на метода (точност)**

Статистически резултати от вътрешнолабораторния тест:

следната таблица представя стойностите за яйчен жълтък.

Следващите данни са получени от международно изучаване на работата на метода, направено съобразно международно съгласувани процедури.

Година на вътрешнолабораторния тест	1998
Брой на лабораториите	24
Брой на пробите	5
Аналит:	яйчен жълтък

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	19	20	22	20	22
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	3	4	2	4	2
Брой на приетите резултати	38	40	44	40	44
Средна стойност	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Стандартно отклонение на повтаряемост (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25

▼**M1**

Проби	А	Б	В	Г	Д
Относително стандартно отклонение на повторяемост (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Лимит на повторяемост (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Стандартно отклонение на възпроизвеждане (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Относително стандартно отклонение на възпроизвеждане (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Лимит на възпроизвеждане (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Видове проби:

А Advocaat, еднообразни дубликати

Б Advocaat, еднообразни дубликати

В Advocaat, еднообразни дубликати

Г Advocaat, (разтворен), нива на разцепване (*)

Д Advocaat, еднообразни дубликати