Ovaj je dokument samo dokumentacijska pomoć za čiji sadržaj institucije ne preuzimaju odgovornost.

►**B**

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 2870/2000

od 19. prosinca 2000.

o utvrđivanju referentnih metoda Zajednice za analizu jakih alkoholnih pića

(SL L 333, 29.12.2000, str. 20)

Promijenio:

		Službeni list		
		br.	stranica	datum
►**M1**	Uredba Komisije (EZ) br. 2091/2002 od 26. studenoga 2002.	L 322	11	27.11.2002

▼B

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 2870/2000

od 19. prosinca 2000.

o utvrđivanju referentnih metoda Zajednice za analizu jakih alkoholnih pića

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske zajednice,

uzimajući u obzir Uredbu Vijeća (EEZ) br. 1576/89 od 29. svibnja 1989. o utvrđivanju općih pravila o definiranju, opisivanju i prezentiranju jakih alkoholnih pića ([1]), kako je izmijenjena Aktom o pristupanju Austrije, Finske i Švedske, a posebno njezin članak 4. stavak 8.,

budući da:

(1) Članak 4. stavak 8. Uredbe (EEZ) br. 1576/89 predviđa usvajanje metoda koje se moraju koristiti u analizi jakih alkoholnih pića. U slučaju službene kontrole ili spora, potrebno je koristiti referentne metode kako bi se osigurala usklađenost s Uredbom (EEZ) br. 1576/89 i Uredbom Komisije (EEZ) br. 1014/90 od 24. travnja 1990. o utvrđivanju detaljnih provedbenih pravila o definiciji, opisivanju i prezentaciji jakih alkoholnih pića ([2]), kako je zadnje izmijenjena Uredbom (EZ) br. 2140/98 ([3]).

(2) U najvećoj mogućoj mjeri bilo bi korisno usvojiti i opisati opće prihvaćene metode kao analitičke referentne metode Zajednice.

(3) Kako bi se uzeo u obzir znanstveni napredak i razlike u opremi službenih laboratorija, mora biti dozvoljena upotreba metoda, pod odgovornošću direktora laboratorija, koje se zasnivaju na drugačijim načelima mjerenja od referentnih metoda opisanih u Prilogu ovoj Uredbi, a gdje takve druge metode nude primjerena jamstva glede rezultata te naročito zadovoljavaju kriterije dane u Prilogu Direktivi Vijeća 85/591/EEZ od 20. prosinca 1985. o uvođenju metoda uzorkovanja i analiza Zajednice za nadzor hrane namijenjene prehrani ljudi ([4]) i ako se može dokazati da su promjene u točnosti, ponovljivosti i usporedivosti dobivenih rezultata u granicama rezultata dobivenih korištenjem referentnih metoda opisanih u ovoj Uredbi. Ako je taj uvjet zadovoljen, potrebno je dopustiti upotrebu drugih metoda analize. Međutim, važno je napomenuti da druge metode ne mogu zamijeniti referentne metode u slučajevima spora.

(4) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Provedbenog odbora za jaka alkoholna pića,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Referentne metode Zajednice za analizu jakih alkoholnih pića, čija je svrha osigurati poštovanje Uredbe (EEZ) br. 1576/89 i Uredbe (EEZ) br. 1014/90:

— u slučaju službene kontrole, ili

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

▼B

— u slučaju spora,

su one metode koje se koriste u Prilogu ovoj Uredbi.

Članak 2.

Neovisno o prvoj alineji članka 1., dozvoljene su druge metode analize za koje je odgovoran direktor laboratorija, pod uvjetom da su točnost i preciznost (ponovljivost i obnovljivost) metoda najmanje jednake onima odgovarajućih referentnih analitičkih metoda koje su navedene u Prilogu.

Članak 3.

Ako nisu utvrđene analitičke referentne metode Zajednice za detekciju i kvantifikaciju sadržaja tvari u određenom jakom alkoholnom piću, koriste se sljedeće metode:

(a) metode analize potvrđene u skladu s međunarodno priznatim postupcima te koje posebno ispunjavaju kriterije određene u Prilogu Direktivi 85/591/EEZ;

(b) metode analize koje su u skladu s preporučenim standardima Međunarodne organizacije za normizaciju (ISO);

(c) metode analize koje je priznala i objavila Glavna skupština Međunarodnog ureda za vino i vinovu lozu (OIV);

(d) u nedostatku metoda kako su navedene u točkama (a), (b) ili (c), zbog njezine točnosti, ponovljivosti i obnovljivosti:

— analitička metoda koju je odobrila dotična država članica,

— gdje je to potrebno, bilo koja druga prikladna metoda.

Članak 4.

Za potrebe ove Uredbe:

(a) „granica ponovljivosti” znači vrijednost manja ili jednaka apsolutnoj razlici između dva rezultata ispitivanja dobivena pod uvjetima ponovljivosti (isti analitičar, isti uređaj, isti laboratorij i kratak vremenski razmak), koja se može očekivati uz vjerojatnost od 95 % {ISO 3534-1};

(b) „granica obnovljivosti” znači vrijednost manja ili jednaka apsolutnoj razlici između dva rezultata ispitivanja dobivena pod uvjetima obnovljivosti (različiti analitičari, različiti uređaji i različiti laboratoriji), koja se može očekivati uz vjerojatnost od 95 % {ISO 3534-1};

(c) „točnost” znači podudarnost između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti {ISO 3534-1}.

Članak 5.

Ova Uredba stupa na snagu sedmog dana od dana objave u *Službenom listu Europskih zajednica.*

Ona se primjenjuje se od 1. siječnja 2001.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

▼B

PRILOG

OPIS REFERENTNIH ANALITIČKIH METODA

I. Određivanje alkoholne jakosti po volumenu

Dodatak I.: Priprema destilata

Dodatak II.: Mjerenje gustoće destilata

— Metoda A = piknometrija

— Metoda B = elektronska denzimetrija

— Metoda C = denzimetrija uz korištenje hidrostatske vage

II. Određivanje ukupnog suhog ekstrakta gravimetrijom

III. Određivanje hlapivih spojeva i metanola

III.1. Opće napomene

III.2. Hlapivi srodni spojevi: aldehidi, viši alkoholi, etil acetat i metanol (plinska kromatografija)

III.3. Hlapiva kiselost (p.m.)

IV. Cijanovodična kiselina (p.m.)

V. Anetol ►M1 ———— ◄

VI. Glicirizinska kiselina ►M1 ———— ◄

VII. Kalkoni ►M1 ———— ◄

VIII. Ukupni šećeri (p.m.)

IX. Žumanjak ►M1 ———— ◄

▼B

I. ODREĐIVANJE ALKOHOLNE JAKOSTI PO VOLUMENU JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA

Uvod

Referentna metoda uključuje dva Dodatka:

Dodatak I.: Priprema destilata

Dodatak II.: Mjerenje gustoće destilata

1. **Svrha**

Ova metoda je prikladna za određivanje stvarne alkoholne jakosti po volumenu jakih alkoholnih pića.

2. **Referentni standardi**

ISO 3696:1987: Voda za upotrebu u analitičkim laboratorijima – Zahtjevi i metode ispitivanja.

3. **Izrazi i definicije**

3.1. *Referentna temperatura:*

Referentna temperatura za određivanje alkoholne jakosti po volumenu, gustoći i specifičnoj težini jakih alkoholnih pića je 20 °C.

Napomena 1.: Izraz „na °C” rezerviran je za sva određivanja (gustoće ili alkoholne jakosti po volumenu) koja su izražena u temperaturi koja nije referentna temperatura od 20 °C.

3.2. *Gustoća:*

Gustoća je masa po jedinici volumena jakih alkoholnih pića na 20 °C u vakuumu. Izražava se u kilogramima po kubičnom metru, a njezin simbol je $\rho_{20\ °C}$ ili ρ_{20}.

3.3. *Relativna gustoća:*

Relativna gustoća je omjer, izražen kao decimalni broj, gustoće jakih alkoholnih pića na 20 °C i gustoće vode na istoj temperaturi. Označava se simbolom $d_{20\ °C/20\ °C}$ ili $d_{20/20}$, ili samo s d kad ne postoji mogućnost zabune. Svojstvo koje je mjereno mora se navesti na certifikatu, a pritom se smiju koristiti samo gore navedeni simboli.

Napomena 2.: Relativna gustoća se može dobiti iz gustoće ρ_{20} na 20 °C:

$\rho_{20} = 998,203 \times d_{20/20}$ sau $d_{20/20} = \rho_{20}/998,203$

gdje je 998,203 gustoća vode na 20 °C.

3.4. *Stvarna alkoholna jakost po volumenu:*

Stvarna alkoholna jakost po volumenu jakih alkoholnih pića jednaka je broju litara etilnog alkohola u 100 litara mješavine vode i alkohola koja ima istu gustoću kao i alkohol ili jako alkoholno piće nakon destilacije. Referentne vrijednosti za alkoholnu jakost po volumenu (vol. %) na 20 °C u odnosu na gustoću na 20 °C za različite mješavine vode i alkohola koje se moraju koristiti su one vrijednosti koje su dane u međunarodnoj tablici koju je usvojila Međunarodna organizacija za zakonsko mjeriteljstvo (*International Legal Metrology Organisation*) u svojoj Preporuci br. 22.

Opća jednadžba koja se odnosi na alkoholnu jakost po volumenu i gustoći mješavine vode i alkohola na zadanoj temperaturi dana je na stranici 40. poglavlja 3. „Alkoholna jakost po volumenu” Priloga Uredbi Komisije (EEZ) br. 2676/90 (SL L 272, 3.10.1990., str. 1.) ili u priručniku za metode analize OIV-a (1994.) (str. 17.).

▼B

Napomena 3.: Za likere i krem likere čiji je volumen teško točno izmjeriti, uzorak se mora izvagati, a alkoholna jakost se prvo računa po masi.

Jednadžba za konverziju:

$$\text{alkoholna jakost po volumenu (\% vol)} = \frac{\text{JAM (\% mase)} \times P_{20}\ \text{(uzorak)}}{P_{20}\ \text{(alkohol)}}$$

gdje je

JAM = alkoholna jakost po masi,

ρ_{20} (alkohol) = 789,24 kg/m^3

4. **Načelo rada**

Nakon destilacije, alkoholna jakost po volumenu destilata određuje se piknometrijom, elektronskom denzimetrijom ili denzimetrijom uz upotrebu hidrostatske vage.

▼B

DODATAK I.: PRIPREMA DESTILATA

1. **Područje primjene**

Ova metoda je prikladna za pripremu destilata koji se koriste za određivanje stvarne alkoholne jakosti po volumenu jakih alkoholnih pića.

2. **Načelo rada**

Jaka alkoholna pića se destiliraju kao bi se odvojio etilni alkohol i drugi hlapivi spojevi iz ekstrakta (supstanci koje se ne destiliraju).

3. **Reagensi i materijali**

3.1. Granule za vrenje.

3.2. Koncentrirana emulzija za sprečavanje pjenušanja (za kremaste likere).

4. **Uređaji i aparatura**

Uobičajena laboratorijska oprema, a naročito sljedeće:

4.1. Vodena kupelj čija se temperatura može održavati na 10 °C do 15 °C.

Vodena kupelj čija se temperatura može održavati na 20 °C (± 0,2 °C).

4.2. Odmjerne tikvice klase A, od 100 ml i 200 ml, koje su umjerene na 0,1 %, odnosno na 0,15 %.

4.3. Aparatura za destilaciju:

4.3.1. Opći zahtjevi

Oprema za destilaciju mora udovoljiti sljedećim zahtjevima:

— broj spojeva ne smije biti veći od strogo određenog minimuma koji je potreban da bi se osigurala nepropusnost sustava,

— uključenje uređaja koji sprečava burno vrenje (gubitak vrele tekućine isparavanjem) i regulira brzinu destilacije para bogatih alkoholom,

— brza i potpuna kondenzacija alkoholnih para,

— skupljanje prvih frakcija destilacije u vodenom mediju.

Izvor topline mora se koristiti uz odgovarajući difuzor topline kako bi se spriječile pirogene reakcije u ekstraktu.

4.3.2. Primjer prikladne opreme za destilaciju prikazan je na slici 1., a uključuje sljedeće dijelove:

— tikvicu od 1 l s okruglim dnom i standardiziranim spojem od brušenog stakla,

— najmanje 20 cm dugu rektifikacijsku kolonu (npr. kolona Vigreux),

— koljenasti konektor s hladilom ravnih rubova koje je dugo približno 10 cm (tipa West) i postavljen okomito (vidjeti sliku 1.),

— 40 cm dugu spiralnu cijev za hlađenje,

— ispusnu cijev kojom se destilat dovodi do dna prihvatne graduirane tikvice s malom količinom vode.

Napomena: Gore opisani uređaj je namijenjen za uzorak od najmanje 200 ml. Međutim, manji uzorci (100 ml) se mogu destilirati upotrebom manjih destilacijskih tikvica, pod uvjetom da se koristi zvono za destilaciju ili neki drugi uređaj za sprečavanje prelaska smjese tekućine i pare u hladilo.

▼B

5. **Skladištenje uzoraka za ispitivanje**

Uzorci se skladište na sobnoj temperaturi prije analize.

6. **Postupak**

Uvodna napomena:

Destilacija se također može vršiti po postupku Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) (1968).

6.1. Provjera aparature za destilaciju.

Aparatura mora imati sljedeća svojstva:

Destilacija 200 ml otopine vode i alkohola poznate koncentracije, volumnog udjela približno 50 % ne smije uzrokovati gubitak alkohola veći od volumnog udjela 0,1 %.

6.2. Jaka alkoholna pića s jakosti ispod 50 % vol.

Odmjeri se 200 ml jakog alkoholnog pića u odmjernu tikvicu.

Zabilježi se temperatura tekućine, ili se održava na standardnoj temperaturi (20 °C).

Uzorak se izlije u tikvicu s okruglim dnom uređaja za destilaciju, a odmjerna tikvica se ispere s tri alikvota od koji svaki sadrži približno 20 ml destilirane vode. Svaki alikvot vode za ispiranje doda se sadržaju destilacijske tikvice.

Napomena: Ovo razrjeđivanje sa 60 ml dovoljno je za jaka alkoholna pića koja sadrže manje od 250 g suhog ekstrakta po litri. U protivnom, da bi se spriječila piroliza, volumen vode za ispiranje mora biti najmanje 70 ml ako je koncentracija suhog ekstrakta 300 g/l, 85 ml ako je koncentracija suhog ekstrakta 400 g/l te 100 ml ako je koncentracija suhog ekstrakta 500 g/l (neki voćni likeri ili kreme). Ti se volumeni podese proporcionalno različitim volumenima uzoraka.

Doda se nekoliko kuglica za vrenje (3.1) (i sredstvo protiv pjenjenja za emulzijske likere).

Ulije se 20 ml destilirane vode u originalnu odmjernu tikvicu od 200 ml koja će se koristiti za čuvanje destilata. Ta se tikvica zatim mora staviti u hladnu vodenu kupelj (4.1) (10 do 15 °C za jaka alkoholna pića s okusom anisa).

Destilira se, izbjegavajući miješanje tekućine s parom i karbonizaciju, uz povremeno miješanje sadržaja tikvice, dok razina destilata nije nekoliko milimetara ispod kalibracijske oznake na odmjernoj tikvici.

Kad temperatura ovog destilata padne unutar 0,5 °C od početne temperature tekućine, dopuni se do oznake destiliranom vodom i dobro promiješa.

Ovaj destilat se koristi za određivanje alkoholne jakosti po volumenu (Dodatak II.)

6.3. Jaka alkoholna pića s jakosti iznad 50 % vol.

Odmjeri se 100 ml jakog alkoholnog pića u odmjernu tikvicu od 100 ml i izlije u tikvicu s okruglim dnom uređaja za destilaciju.

Odmjerna tikvica se ispere nekoliko puta destiliranom vodom i ispirci se dodaju sadržaju destilacijske tikvice s okruglim dnom. Mora se koristiti dovoljno vode da sadržaj tikvice dosegne približno 230 ml.

Izlije se 20 ml destilirane vode u odmjernu tikvicu od 200 ml koja će se koristiti za čuvanje destilata. Ta se tikvica zatim mora staviti u hladnu vodenu kupelj (4.1) (10 do 15 °C za jaka alkoholna pića s okusom anisa).

▼B

Destilira se, uz povremeno miješanje destilata, dok se razina destilata ne spusti nekoliko milimetara ispod kalibracijske oznake na odmjernoj tikvici od 200 ml.

Kad temperatura ovog destilata padne unutar 0,5 °C od početne temperature tekućine, dopuni se do oznake destiliranom vodom i dobro promiješa.

Ovaj destilat se koristi za određivanje alkoholne jakosti po volumenu (Dodatak II.)

Napomena: Alkoholna jakost po volumenu jakog alkoholnog pića je dva puta veća od alkoholne jakosti destilata.

▼B

DODATAK II.: MJERENJE GUSTOĆE DESTILATA

METODA A: ODREĐIVANJE STVARNE ALKOHOLNE JAKOSTI PO VOLUMENU JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA — MJERENJE PIKNOMETRIJOM

A.1. **Načelo rada**

Alkoholna jakost po volumenu dobije se iz gustoće destilata izmjerene piknometrijom.

A.2. **Reagensi i materijali**

Tijekom analize, ako nije drukčije određeno, koriste se samo reagensi potvrđene analitičke kvalitete i voda čiji stupanj kvalitete je najmanje 3 u skladu s definicijom iz standarda ISO 3696:1987.

A.2.1. Otopina natrijeva klorida (2 %-tna, m/V)

Za pripremu 1 litre, odvagne se 20 g natrijeva klorida i otopi u vodi do tako da volumen otopine bude 1 l.

A.3. **Uređaji i oprema**

Uobičajena laboratorijska oprema, a naročito sljedeće:

A.3.1. Analitička vaga s preciznošću očitavanja od 0,1 mg.

A.3.2. Termometar, sa spojem od brušenog stakla, kalibriran na desetinu stupnja od 10 do 30 °C. Ovaj se termometar mora umjeriti ili provjeriti u odnosu na umjereni termometar.

A.3.3. Piknometar od pireks stakla, čiji kapacitet je približno 100 ml, opremljen termometrom s brušenim staklom koji se može skinuti (A.3.2.). Piknometar ima bočnu cijev dužine 25 mm i unutarnji promjer od 1 mm (najviše) te konusni brušeni spoj. Drugi piknometri su opisani u standardu ISO 3507, npr. može se koristiti piknometar od 50 ml ako je prikladno.

A.3.4. Tara posuda istog vanjskog volumena (unutar 1 ml) kao i piknometar te mase jednake masi piknometra napunjenog tekućinom gustoće od 1,01 (otopina natrijeva klorida A.2.1.).

A.3.5. Toplinski izolirana posuda koja točno pristaje uz tijelo piknometra.

Napomena 1.: Metoda za određivanje gustoće u vakuumu jakih alkoholnih pića zahtijeva upotrebu vage s dvije plitice, piknometra i tara posude istog vanjskog volumena kako bi se u svakom trenutku poništio učinak tlaka zraka. Ova jednostavna tehnika se može koristiti i s vagom s jednom pliticom, pod uvjetom da se tara posuda izvaže ponovo kako bi se pratilo povećanje tlaka zraka tijekom vremena.

A.4. **Postupak**

Uvodne napomene:

Sljedeći postupak je opisan za upotrebu piknometra od 100 ml u određivanju alkoholne jakosti; daje najveću točnost. Međutim može se koristiti i manji piknometar, na primjer od 50 ml.

A.4.1. Umjeravanje piknometra

Piknometar se umjerava određivanjem sljedećih parametara:

— tare praznog piknometra,

— volumena piknometra na 20 °C,

— mase piknometra napunjenog vodom na 20 °C.

▼B

A.4.1.1. Umjeravanje upotrebom vage s jednom pliticom:

Odredi se:

— masa čistog, suhog piknometra (P),

— masa piknometra napunjenog vodom na t °C (P_1),

— masa tara posude (T_0).

A.4.1.1.1. Izvaže se čisti i suhi piknometar (P).

A.4.1.1.2. Piknometar se pažljivo napuni destiliranom vodom na temperaturi okoliša i priključi se termometar.

Piknometar se pažljivo osuši krpom i stavi u toplinski izoliranu posudu. Miješa se okretanjem spremnika do stalne temperature na termometru.

Razina se točno podesi do gornjeg ruba bočne cijevi. Pažljivo se očita temperatura t °C te, ako je potrebno, ispravi za bilo kakvu netočnost na temperaturnoj skali.

Izvaže se piknometar napunjen vodom (P_1).

A.4.1.1.3. Izvaže se tara posuda (T_0).

A.4.1.1.4. Izračunavanje

— Tara praznog piknometra = P – m

gdje je m masa zraka u piknometru.

$m = 0{,}0012 \times (P_1 - P)$

Napomena 2.: 0,0012 je gustoća suhog zraka na 20 °C pri tlaku od 760 mm Hg

— Volumen piknometra na 20 °C:

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

gdje je HUF faktor za temperaturu t °C uzet iz tablice I. poglavlja.1 „Gustoća i relativna gustoća" Priloga Uredbi (EEZ) br. 2676/90 (str. 10).

$V_{20\,°C}$ se mora odrediti s točnošću od 0,001 ml.

— Masa vode u piknometru na 20 °C:

$M_{20°C} = V_{20°C}$ñ$0,998203$,

gdje je 0,998203 gustoća vode na 20 °C.

Napomena 3.: Ako je potrebno, može se koristiti vrijednost gustoće u zraku, 0,99715, a alkoholna jakost izračunati s obzirom na vrijednosti gustoće u zraku iz tablica službi za carine i trošarine Ujedinjene Kraljevine.

A.4.1.2. Metoda za kalibriranje uz upotrebu vage s dvije plitice:

A.4.1.2.1. Tara posuda se stavi na lijevu pliticu, a čisti, suhi piknometar s prihvatnim čepom na desnu pliticu. Uravnoteže se postavljanjem utega na stranu piknometra: p grama.

A.4.1.2.2. Piknometar se pažljivo napuni destiliranom vodom na temperaturi okoliša i priključi se termometar; piknometar se pažljivo osuši krpom i stavi u plašt s toplinskom izolacijom. Miješa se okretanjem spremnika do konstantne temperature na termometru.

Razina se točno podesi do gornjeg ruba bočne cijevi. Očisti se bočna cijev, namjesti prihvatni čep, pažljivo očita temperatura t °C te, ako je potrebno, podesi temperaturna skala.

Izvaže se piknometar napunjen vodom, a p' je masa uravnoteženja u gramima.

▼B

A.4.1.2.3. Izračunavanje

— Tara praznog piknometra = p + m

gdje je m masa zraka u piknometru.

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

— Volumen piknometra na 20 °C:

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

gdje je HUF faktor za temperaturu t °C uzet iz tablice I. poglavlja 1. „Gustoća i relativna gustoća" Priloga Uredbi (EEZ) br. 2676/90 (str. 10.).

$V_{20\,°C}$ se mora odrediti s točnošću od 0,001 ml.

— Masa vode u piknometru na 20 °C:

$M_{20°C} = V_{20°C} \times 0,998203$

gdje je 0,998203 gustoća vode na 20 °C.

A.4.2. Određivanje alkoholne jakosti uzorka za ispitivanje

A.4.2.1. Upotreba vage s jednom pliticom.

A.4.2.1.1. Izvaže se tara posuda, masa T_1.

A.4.2.1.2. Izvaže se piknometar s pripremljenim destilatom (vidjeti Dodatak I.); P_2 je njegova masa na t °C.

A.4.2.1.3. Izračunavanje

— $dT = T1 - T0$

— Masa praznog piknometra u trenutku mjerenja

$= P - m + dT$

— Masa tekućine u piknometru na t °C

$= P_2 - (P - m + dT)$

— Gustoća na t °C u g/ml

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

— Gustoća na t °C se izrazi u kilogramima po m^3 množenjem $\rho_{t\,°C}$ sa 1 000, vrijednost koja je poznata kao ρ_t.

— ρ_t se ispravi na 20 korištenjem tablice gustoća ρT za mješavine alkohola i vode (tablica II. Dodatka II. Priručnika za metode analize OIV-a (1994.), str. 17.-29.).

U toj se tablici na horizontalnoj liniji koja odgovara temperaturi T u cijelim stupnjevima, odmah ispod t °C, pronađe najmanja gustoća iznad ρ_t. Razlika očitana ispod te gustoće koristi se za računanje gustoće ρ_t jakog alkoholnog pića na toj temperaturi T u cijelim stupnjevima.

— Korištenjem cijele temperaturne linije izračuna se razlika između gustoće ρ' iz tablice odmah iznad ρ_t i izračunane gustoće ρ_t. Ta se razlika podijeli s razlikom koja se u tablici nalazi desno od gustoće ρ'. Kvocijent je decimalni omjer alkoholne jakosti, dok se cijeli broj alkoholne jakosti nalazi na vrhu stupca u kojem se nalazi gustoća ρ' (Dt, alkoholna jakost).

Napomena 4.: Piknometar se može držati i u vodenoj kupelji na 20 °C (± 0,2 °C) kod nadopunjavanja do oznake.

A.4.2.1.4. Rezultat

Korištenjem gustoće ρ_{20} izračuna se stvarna alkoholna jakost uz upotrebu tablica s vrijednostima alkoholne jakosti koje su prikazane dalje u tekstu.

▼B

Tablica koja navodi vrijednost alkoholne jakosti po volumenu (vol. %) na 20 °C s obzirom na gustoću na 20 °C mješavina vode i alkohola je međunarodna tablica koju je usvojila Međunarodna organizacija za zakonsko mjeriteljstvo (*International Legal Metrology Organisation*) u svojoj Preporuci br. 22.

A.4.2.2. Metoda u kojoj se koristi vaga s jednom pliticom

A.4.2.2.1. Izvaže se piknometar s pripremljenim destilatom (vidjeti dio I.); p" je masa na t °C.

A.4.2.2.2. Izračunavanje

— Masa tekućine u piknometru na t °C

$= p + m - p''$

— Gustoća na t °C u g/ml

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

— Gustoća na t °C se izrazi u kilogramima po m^3 i korigira se temperatura za računanje alkoholne jakosti na 20 °C, kao što je navedeno u tekstu gore za upotrebu vage s jednom pliticom.

A.5. **Svojstva metode (preciznost)**

A.5.1. Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Sljedeći podaci su dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima [1] [2].

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	20
Broj uzoraka	6

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Broj laboratorija zadržan nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	19	20	17	19	19	17
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	1	—	2	1	1	3
Broj prihvaćenih rezultata	38	40	34	38	38	34
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) vol. %	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Standardna ponovljivost (S_r) vol. %	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Granica ponovljivosti (r) u vol. %	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) vol. %	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53

▼B

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Granica obnovljivosti (R) u vol. %	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Vrste uzoraka
A voćni liker; razine razdiobe (*)
B brandy; dvostruke slijepe probe
C viski; dvostruke slijepe probe
D grapa; razine razdiobe (*)
E akvavit; razine razdiobe (*)
F rum; razine razdiobe (*)

METODA B: ODREĐIVANJE STVARNE ALKOHOLNE JAKOSTI PO VOLUMENU JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA – MJERENJE ELEKTRONSKOM DENZIMETRIJOM (KOJA SE TEMELJI NA OSCILACIJI REZONANTNE FREKVENCIJE UZORKA U OSCILACIJSKOJ ĆELIJI)

B.1. **Načelo rada**

Gustoća tekućine se određuje elektronskim mjerenjem oscilacija vibrirajuće U-cijevi. Uzorak se za potrebe mjerenja dodaje oscilirajućem sustavu, čija se specifična frekvencija oscilacije mijenja zbog dodane mase.

B.2. **Reagensi i materijali**

Tijekom analize, ako nije drukčije navedeno, koriste se samo reagensi utvrđene analitičke kvalitete i stupnja kvalitete vode od najmanje 3, kako je određeno u standardu ISO 3696:1987.

B.2.1. Aceton (CAS 666-52-4) ili apsolutni alkohol

B.2.2. Suhi zrak

B.3. **Uređaji i oprema**

Uobičajena elektronska oprema, a posebno:

B.3.1. Digitalni denzimetar

Elektronski denzimetar za takva mjerenja mora izraziti gustoću u g/ml na 5 decimalnih mjesta.

Napomena 1.: Denzimetar se mora staviti na potpuno stabilan stalak koji je izoliran od svih vibracija.

B.3.2. Regulacija temperature

Rad denzimetra je valjan samo ako je mjerna ćelija spojena s ugrađenim regulatorom temperature koji može postići stabilnost temperature od ± 0,02 °C ili bolju.

Napomena 2.: Precizno podešavanje i nadzor temperature u mjernoj ćeliji su jako važni, budući da pogreška od 0,1 °C može dovesti do odstupanja u gustoći od otprilike 0,1 kg/m^3.

B.3.3. Šprice za injektiranje uzorka ili automatski uzorkivač

B.4. **Postupak**

B.4.1. Kalibriranje denzimetra

Uređaj se mora kalibrirati u skladu s uputama proizvođača prilikom prve upotrebe. Nakon toga se mora redovno kalibrirati i provjeravati u odnosu na certificirani referentni standard ili internu laboratorijsku referentnu otopinu pripremljenu od certificiranog referentnog standarda.

▼B

B.4.2. Određivanje gustoće uzorka

B.4.2.1. Ako je potrebno, prije mjerenja se ćelija očisti i osuši acetonom ili apsolutnim alkoholom i osuši na zraku. Ispere se uzorkom.

B.4.2.2. Uzorak se ubrizga u ćeliju (korištenjem šprice ili automatskog uzorkivača) tako da je ćelija potpuno napunjena. Tijekom punjenja mora se paziti da se potpuno uklone mjehurići zraka. Uzorak mora biti homogen i ne smije sadržavati krute čestice. Prije analize, sve suspendirane čestice se moraju ukloniti filtracijom.

B.4.2.3. Kad se očitana vrijednost stabilizira, zabilježi se gustoća ρ_{20} ili alkoholna jakost prikazana na denzimetru.

B.4.3. Rezultat

Kad se koristi gustoća ρ_{20}, izračuna se stvarna alkoholna jakost upotrebom tablica s vrijednostima alkoholne jakosti koje su dane dalje u tekstu.

Tablica koja navodi vrijednost alkoholne jakosti po volumenu (vol. %) na 20 °C s obzirom na gustoću na 20 °C mješavina vode i alkohola je međunarodna tablica koju je usvojila Međunarodna organizacija za zakonsko mjeriteljstvo (*International Legal Metrology Organisation*) u svojoj Preporuci br. 22.

B.5. **Svojstva metode (preciznost)**

B.5.1. Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Sljedeći podaci su dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima [1] [2].

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	16
Broj uzoraka	6

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Broj laboratorija zadržan nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	11	13	15	16	14	13
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	2	3	1	—	1	2
Broj prihvaćenih rezultata	22	26	30	32	28	26
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) vol. %	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) vol. %	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Granica ponovljivosti (r) vol. %	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) vol. %	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34

▼B

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Granica obnovljivosti (R) vol. %	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Vrste uzoraka
A voćni liker; razina razdiobe (*)
B brandy; dvostruko slijepe probe
C viski; dvostruko slijepe probe
D grapa; razine razdiobe (*)
E akvavit; razine razdiobe (*)
F rum; razine razdiobe (*)

METODA C: ODREĐIVANJE STVARNE ALKOHOLNE JAKOSTI PO VOLUMENU JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA – MJERENJE DENZIMETRIJOM UZ UPOTREBU HIDROSTATSKE VAGE

C.1. Načelo rada

Alkoholna jakost jakih alkoholnih pića se može odrediti denzimetrijom uz pomoć hidrostatske vage slijedeći Arhimedov zakon po kojem svako tijelo uronjeno u tekućinu dobiva vertikalni uzgon koji je jednak masi istisnute tekućine, (tj. svako tijelo uronjeno u tekućinu prividno gubi na masi onoliko koliko iznosi masa tijelom istisnute tekućine.)

C.2. Reagensi i materijali

Tijekom analize, osim ako nije drukčije navedeno, koriste se samo reagensi utvrđene analitičke kvalitete i stupnja kvalitete vode od najmanje 3, kao što je definirano u standardu ISO 3696:1987.

C.2.1. Otopina za čišćenje plovka (natrijev hidroksid, 30 %-tna m/V)

Za pripremu 100 ml, odvagne se 30 g natrijeva hidroksida i dopuni do oznake etanolom volumnog udjela 96 %.

C.3. Uređaji i oprema

Uobičajena laboratorijska oprema, a naročito sljedeće:

C.3.1. Hidrostatska vaga s jednom pliticom i osjetljivošću od 1 mg.

C.3.2. Plovak volumena najmanje 20 ml, posebno prilagođen vagi, obješen na niti čiji promjer ne prelazi 0,1 mm.

C.3.3. Menzura s oznakama razine. Plovak mora moći potpuno zauzeti volumen menzure ispod oznake; kroz površinu tekućine može prolaziti samo nit. Unutarnji promjer menzure mora biti najmanje 6 mm veći od unutarnjeg promjera plovka.

C.3.4. Termometar (ili temperaturna sonda) označen u stupnjevima i desetinkama stupnja od 10 do 40 °C, kalibriran na 0,05 °C.

C.3.5. Utezi koje je kalibriralo tijelo priznato za certifikaciju.

Napomena 1.: Moguća je i upotreba vage s dvije plitice; način rada je opisan u poglavlju 1. „Gustoća i relativna gustoća” Priloga Uredbi (EEZ) br. 2676/90 (str. 7.).

C.4. Postupak

Plovak i menzura se moraju čistiti između svakog mjerenja destiliranom vodom, osušiti mekanim laboratorijskim papirom koji ne pušta vlakna te isprati otopinom kojoj se mora odrediti gustoća. Mjerenje se mora izvršiti čim se postigne stabilnost uređaja kako bi se ograničio gubitak alkohola isparavanjem.

▼B

C.4.1. Kalibriranje vage

Iako vage obično imaju unutarnji sustav za kalibriranje, mora postojati mogućnost kalibriranja hidrostatske vage pomoću utega koje je provjerilo službeno tijelo za certifikaciju.

C.4.2. Kalibriranje plovka

C.4.2.1. Menzura se napuni do oznake dvostruko destiliranom vodom (ili vodom ekvivalentne čistoće, npr. mikrofiltriranom vodom čija provodnost iznosi 18,2 MΩ/cm na temperaturi između 15 i 25 °C, ali najbolje na 20 °C.

C.4.2.2. Uroni se plovak i termometar, promiješa, očita gustoća tekućine s uređaja te, ako je potrebno, ispravi očitana vrijednost tako da bude jednaka vrijednosti vode pri mjerenju temperature.

C.4.3. Provjera korištenjem otopine alkohola u vodi

C.4.3.1. Menzura se dopuni do oznake mješavinom vode i alkohola poznate jakosti na temperaturi između 15 i 25 °C, ali najbolje na 20 °C.

C.4.3.2. Uroni se plovak i termometar, promiješa i očita gustoća tekućine (ili alkoholna jakost ako je moguće) s uređaja. Utvrđena alkoholna jakost mora biti jednaka prethodno utvrđenoj alkoholnoj jakosti.

Napomena 2.: Ova otopina poznate alkoholne jakosti također se može koristiti za kalibriranje plovka umjesto redestilirane vode.

C.4.4. Mjerenje gustoće destilata (ili njegove alkoholne jakosti, ako se može izmjeriti na tom uređaju)

C.4.4.1. Uzorak za ispitivanje se izlije u menzuru do oznake.

C.4.4.2. Uroni se plovak i termometar, promiješa i očita gustoća tekućine (ili alkoholna jakost, ako je to moguće) s uređaja. Zabilježi se temperatura ako se gustoća mjeri na t °C (ρ_t).

C.4.4.3. Ispravi se ρ_t na 20 korištenjem tablice s vrijednostima gustoće ρ_t za mješavine vode i alkohola (tablica II. Priloga II. Priručnika za metode analize OIV-a (1994.), str. 17.-29.).

C.4.5. Čišćenje plovka i menzure

C.4.5.1. Plovak se uroni u otopinu za čišćenje plovka u menzuri.

C.4.5.2. Plovak se ostavi namakati sat vremena uz periodično okretanje.

C.4.5.3. Ispere se s puno vodovodne vode, a nakon toga destiliranom vodom.

C.4.5.4. Osuši se mekanim laboratorijskim papirom koji ne ostavlja vlakna.

Ovaj postupak se izvodi prilikom prve upotrebe plovka, a zatim redovno prema potrebi.

C.4.6. Rezultat

Na osnovi gustoće ρ_{20}, izračuna se stvarna alkoholna jakost upotrebom tablica s vrijednostima alkoholne jakosti koje su dane dalje u tekstu.

Tablica koja navodi vrijednost alkoholne jakosti po volumenu (vol. %) na 20 °C s obzirom na gustoću na 20 °C mješavina alkohola i vode je međunarodna tablica koju je usvojila Međunarodna organizacija za zakonsko mjeriteljstvo (*International Legal Metrology Organisation*) u svojoj Preporuci br. 22.

▼B

C.5. **Svojstva metode (preciznost)**

C.5.1. Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

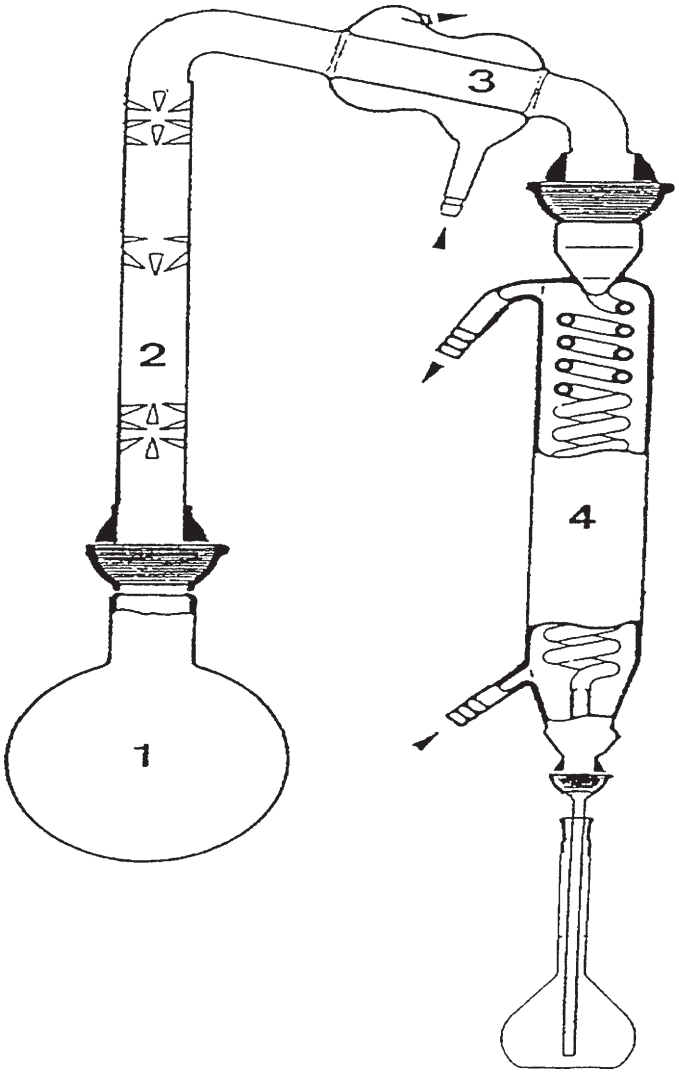
Sljedeći podaci su dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima [1] [2].

Godina međunarodnog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	12
Broj uzoraka	6

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	12	10	11	12	11	9
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	—	2	1	—	1	2
Broj prihvaćenih rezultata	24	20	22	24	22	18
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) vol. %	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) vol. %	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Granica ponovljivosti (r) vol. %	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) vol. %	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Granica obnovljivosti (R) vol. %	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Vrste uzoraka
A voćni liker; razine razdiobe (*)
B brandy: dvostruko slijepe probe
C viski; dvostruko slijepe probe
D grapa: razine razdiobe (*)
E akvavit; razine razdiobe (*)
F rum; razine razdiobe (*)

▼B



Slika 1. Uređaj za destilaciju za mjerenje stvarne alkoholne jakosti po volumenu jakih alkoholnih pića

1. Tikvica s okruglim dnom od 1 litre sa standardiziranim oblim spojem od brušenog stakla
2. 20 cm rektifikacijska kolona Vigreux
3. 10 cm hladilo West s ravnim rubom
4. 40 cm spiralna cijev za hlađenje

▼B

II. ODREĐIVANJE UKUPNOG SUHOG EKSTRAKTA U JAKIM ALKOHOLNIM PIĆIMA GRAVIMETRIJOM

1. **Područje primjene**

Uredba (EEZ) br. 1576/89 predviđa ovu metodu samo za akvavit gdje je suhi ekstrakt ograničen na 15 g/l.

2. **Referentni standardi**

ISO 3696:1987: Voda za upotrebu u analitičkom laboratoriju — Zahtjevi i metode ispitivanja.

3. **Definicija**

Ukupni suhi ekstrakt ili ukupna suha tvar uključuje sve tvari koje nisu hlapive u određenim fizikalnim uvjetima.

4. **Načelo rada**

Vaganje ostatka nakon isparavanja jakog alkoholnog pića u kipućoj vodenoj kupelji i sušenja u sušioniku.

5. **Uređaji i oprema**

5.1. Cilindrična posuda za isparavanje s ravnim dnom promjera 55 mm.

5.2. Kipuća vodena kupelj.

5.3. Pipeta od 25 ml, klase A.

5.4. Sušionik.

5.5. Eksikator.

5.6. Analitička vaga s preciznošću očitavanja od 0,1 mg.

6. **Uzorkovanje i uzorci**

Uzorci se drže na sobnoj temperaturi prije analize.

7. **Postupak**

7.1. U prethodno izvaganu cilindričnu posudu za isparavanje s ravnim dnom promjera 55 mm pipetira se 25 ml jakog alkoholnog pića koje sadrži manje od 15 g/l suhog ekstrakta. Tijekom prvog sata isparavanja, posuda za isparavanje se stavi na poklopac kipuće vodene kupelji tako da tekućina neće vreti jer bi to moglo dovesti do gubitka zbog prskanja. Ostavi se još sat vremena u izravnom kontaktu s parom kipuće vodene kupelji.

7.2. Sušenje se završi stavljanjem posude za isparavanje na dva sata u sušionik na 105 °C ± 3 °C. Posuda za isparavanje se hladi u eksikatoru i izvaže s njezinim sadržajem.

8. **Izračunavanje**

Masa ostatka pomnožena s 40 jednaka je suhom ekstraktu u jakom alkoholnom piću i mora se izraziti u g/l do jednog decimalnog mjesta.

9. **Svojstva metode (preciznost)**

9.1. Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Sljedeći podaci su dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima [1] [2].

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	10
Broj uzoraka	4

▼B

Uzorci	A	B	C	D
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	9	9	8	9
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	1	1	2	—
Broj prihvaćenih rezultata	18	18	16	18
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) g/l	9,0	9,1	7,8	10,0
		9,4	11,8	11,1
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Granica ponovljivosti (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Granica obnovljivosti (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B rum; razine razdiobe
C grapa; razine razdiobe
D akvavit; razine razdiobe

▼B

III. ODREĐIVANJE HLAPIVIH SUPSTANCI I METANOLA U JAKIM ALKOHOLNIM PIĆIMA

III.1. OPĆE NAPOMENE

1. **Definicije**

Uredba (EEZ) br. 1576/89 određuje najmanje razine hlapivih spojeva, osim etanola i metanola, za niz alkoholnih pića (rum, jaka alkoholna pića na temelju vina i vinove loze, voćne rakije itd.). Samo za ovu skupinu pića se konvencionalno smatra da su te razine jednake zbroju koncentracija:

1. hlapivih kiselina izraženih kao octena kiselina;

2. aldehida izraženih kao etanal zbrajanjem etanala (acetaldehida) i dijela etanala u 1,1-dietoksietanu (acetalu);

3. sljedećih viših alkohola: propan-1-ola, butan-1-ola, butan-2-ola, 2-metil propan-1-ola, određenih i izraženih pojedinačno te 2-metil butan-1-ola i 3-metil butan-1-ola određenih i izraženih pojedinačno ili kao njihov zbroj;

4. etil acetata.

Sljedeće metode su konvencionalne metode za mjerenje hlapivih spojeva:

— hlapivih kiselina pomoću hlapive kiselosti,

— aldehida (etanala i acetala), etil acetata i alkohola pomoću plinske kromatografije (GPC).

2. **Analiza hlapivih spojeva plinskom kromatografijom**

Analiza hlapivih spojeva plinskom kromatografijom, osim spojeva koji su navedeni u prethodnom tekstu, može se pokazati posebno zanimljivom kao sredstvo za određivanje kako podrijetla sirovine koja se koristi u destilaciji, tako i stvarnih uvjeta destilacije.

Neka jaka alkoholna pića sadrže druge hlapive komponente, kao što su aromatski spojevi, koji su karakteristični za sirovine koje se koriste za dobivanje alkohola, aromu jakog alkoholnog pića i specifičnosti pripreme jakih alkoholnog pića. Ti su spojevi važni za procjenu zahtjeva određenih Uredbom (EEZ) br. 1576/89.

III.2. ODREĐIVANJE SRODNIH HLAPIVIH SPOJEVA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM: ALDEHIDA, VIŠIH ALKOHOLA, ETIL ACETATA I METANOLA

1. **Područje primjene**

Ova metoda je prikladna za određivanje 1,1-dietoksietana (acetala), 2-metil butan-1-ola (aktivnog amilnog alkohola), 3-metil butan-1-ola (izoamilnog alkohola), metanola (metilnog alkohola), etil etanoata (etil acetata), butan-1-ola (n-butanola), butan-2-ola (sec-butanola), 2-metil propan-1-ola (izobutil alkohola), propan-1-ola (n-propanola) i etanala (acetaldehida) u jakim alkoholnim pićima primjenom plinske kromatografije. U ovoj se metodi koristi interni standard, na primjer pentan-3-ol. Koncentracije analita se izražavaju u gramima na 100 litara apsolutnog alkohola; alkoholna jakost proizvoda mora se odrediti prije analize. Jaka alkoholna pića koja se mogu analizirati primjenom ove metode su viski, brandy, rum, rakija od grožđa, voćna rakija i lozovača.

2. **Referentni standardi**

ISO 3696:1987: Voda za upotrebu u analitičkom laboratoriju — Zahtjevi i metode ispitivanja.

▼B

3. **Definicija**

Srodni spojevi su hlapive supstance koje nastaju uz etanol tijekom fermentacije, destilacije i zrenja jakih alkoholnih pića.

4. **Načelo rada**

Srodni spojevi u jakim alkoholnim pićima se određuju direktnim ubrizgavanjem alkoholnog pića ili prikladno razrijeđenog jakog alkoholnog pića u sustav za plinsku kromatografiju (GC). Prije ubrizgavanja jakom alkoholnom piću se doda odgovarajući interni standard. Srodni spojevi se odvajaju temperaturnim programiranjem na odgovarajućoj koloni, a detektiraju primjenom detektora za plamenu ionizaciju. Koncentracija svakog srodnog spoja određuje se s obzirom na interni standard iz faktora odgovora, koji se dobiju tijekom kalibriranja pod istim kromatografskim uvjetima kakvi se primjenjuju i u analizi jakih alkoholnih pića.

5. **Reagensi i materijali**

Ako nije drukčije navedeno, koriste se samo reagensi čija čistoća je veća od 97 %, a koji su nabavljeni od dobavljača koji posjeduje ISO certifikat i koji su popraćeni potvrdom o čistoći te ne sadrže druge srodne spojeve pri test razrjeđenju (to se može potvrditi injektiranjem pojedinačnih standarda srodnog spoja pri test razrjeđenju uz kromatografske uvjete kao pod točkom 6.4.), te samo voda čija je kvaliteta najmanje 3 u skladu sa standardom ISO 3696. Acetal i acetaldehid se moraju držati na tamnom mjestu i temperaturi < 5 °C. Svi drugi reagensi mogu se držati na sobnoj temperaturi.

5.1. Apsolutni etanol (CAS 64-17-5).

5.2. Metanol (CAS 67-56-1).

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

5.4. 2-metil propan-1-ol (CAS 78-33-1).

5.5. Prihvatljivi interni standardi: pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-metil pentan-1-ol (CAS 626-89-1) ili metil nonanoat (CAS 1731-84-6).

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

5.7. 3-metil butan-1-ol (CAS 123-51-3).

5.8. Etil acetat (CAS 141-78-6).

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

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

5.11. Acetaldehid (CAS 75-07-0).

5.12. Acetal (CAS 105-57-7).

5.13. Otopina etanola volumnog udjela 40 %.

Za pripremu 400 ml/l otopine etanola, ulije se 400 ml etanola (5.1.) u odmjernu tikvicu od 1 litre, dopuni do oznake destiliranom vodom i promiješa.

5.14. Priprema i čuvanje standardne otopine (postupak koji se koristi za validiranu metodu).

Sve otopine standarda moraju se držati na < 5 °C te se moraju pripremati svježe jednom mjesečno. Mase komponenti i otopina moraju se zaokružiti na 0,1 mg.

▼B

5.14.1. Standardna otopina — A

U odmjernu tikvicu od 100 ml, koja sadrži približno 60 ml otopine etanola (5.13.) kako bi se smanjilo isparavanje komponenti, pipetiraju se sljedeći reagensi, dopuni se do oznake otopinom etanola (5.13.) i dobro promiješa. Zabilježi se masa tikvice, svake dodane komponente i krajnja ukupna masa sadržaja.

Komponenta	Volumen (ml)
Metanol (5.2.)	3,0
Propan 1-ol (5.3.)	3,0
2-metil propan-1-ol (5.4.)	3,0
2-metil butan-1-ol (5.6.)	3,0
3-metil butan-1-ol (5.7.)	3,0
Etil acetat (5.8.)	3,0
Butan-1-ol (5.9.)	3,0
Butan-2-ol (5.10.)	3,0
Acetaldehid (5.11.)	3,0
Acetal (5.12.)	3,0

Napomena 1.: Poželjno je acetal i acetaldehid dodati posljednje u nizu kako bi se smanjio gubitak isparavanjem.

5.14.2. Standardna otopina — B

U odmjernu tikvicu od 100 ml, koja sadrži približno 80 ml otopine etanola (5.13.), pipetira se 3 ml pentan-3-ola ili drugog odgovarajućeg internog standarda (5.5.), dopuni do oznake otopinom etanola (5.13) i dobro promiješa.

Zabilježi se masa tikvice, masa pentan-3-ola ili drugog dodanog internog standarda i ukupna krajnja masa sadržaja.

5.14.3. Standardna otopina — C

U odmjernu tikvicu od 100 ml, koja sadrži otprilike 80 ml otopine etanola (5.13.), pipetira se 1 ml otopine A (5.14.1.) i 1 ml otopine B (5.14.2.), dopuni do oznake otopinom etanola (5.13.) i dobro promiješa.

Zabilježi se masa tikvice, masa svake dodane komponente i ukupna krajnja masa sadržaja.

5.14.4. Standardna otopina — D

Kako bi se zadržao kontinuitet analize, pripremi se standard za provjeru rada sustava korištenjem prethodno pripremljenog standarda A (5.14.1.). U odmjernu tikvicu od 100 ml, koja sadrži približno 80 ml otopine etanola (5.13.), pipetira se 1 ml otopine A (5.14.1.), dopuni do oznake otopinom etanola (5.13.) i dobro promiješa.

Zabilježi se masa tikvice, masa svake dodane komponente i ukupna krajnja masa sadržaja.

5.14.5. Standardna otopina — E

U odmjernu tikvicu od 100 ml, koja sadrži približno 80 ml otopine etanola (5.13.), pipetira se 10 ml otopine B (5.14.2.), dopuni do oznake otopinom etanola (5.13.) i dobro promiješa.

Zabilježi se masa tikvice, masa svake dodane komponente i ukupna krajnja masa sadržaja.

▼B

5.14.6. Otopine standarda koje se koriste za provjeru linearnosti odgovora detektora za plamenu ionizaciju

U odvojene odmjerne tikvice od 100 ml, koje sadrže približno 80 ml etanola (5.13.), pipetira se 0, 0,1, 0,5, 1,0 i 2,0 ml otopine A (5.14.1.) te 1 ml otopine B (5.14.2.), dopuni do oznake otopinom etanola (5.13.) i dobro promiješa.

Zabilježi se masa tikvice, masa svake dodane komponente i ukupna krajnja masa sadržaja.

5.14.7. Standardna otopina za provjeru rada sustava

U posudu za vaganje se pipetira 9 ml standardne otopine D (5.14.4.) i 1 ml standardne otopine E (5.14.5.) te dobro promiješa.

Zabilježi se masa tikvice, masa svake dodane komponente i ukupna krajnja masa sadržaja.

6. **Uređaji i aparatura**

6.1. Uređaj za mjerenje gustoće i alkoholne jakosti.

6.2. Analitička vaga s mogućnošću očitavanja do četiri decimalna mjesta.

6.3. Temperaturno programiran plinski kromatograf, opremljen detektorom za plamenu ionizaciju i integratorom ili nekim drugim sustavom za obradu podataka koji može mjeriti površine ili visine vršaka.

6.4. Kolona(e) plinskog kromatografa koja može odvajati analite tako da je najmanja rezolucija između pojedinačnih komponenti (osim 2-metil butan-1-ola i 3-metil butan-1-ola) barem 1,3.

Napomena 2.: Sljedeće kolone i uvjeti plinske kromatografije su prikladni primjeri:

1. Pretkolona promjera 1 m × 0,32 mm, spojena na kolonu CP-WAX 57 CB s unutarnjim promjerom od 50 m × 0,32 mm i debljinom filma od 0,2 μm (stabilizirani polietilen glikol), te zatim kolonu Carbowax 400 unutarnjeg promjera od 50 m × 0,32 mm i debljine filma od 0,2 μm. (Kolone su spojene korištenjem utisnutog konektora bez mrtvog volumena.)

Plin nositelj i tlak:	helij (135 kPa)
Temperatura kolone:	35 °C tijekom 17 min., 35 do 70 °C na 12 °C/min., zadržavanje na 70 °C tijekom 25 min.
Temperatura injektora:	150 °C
Temperatura detektora:	250 °C
Volumen injektiranja:	1 μl, razdjeljenje 20 do 100:1

2. Pretkolona promjera 1 m × 0,32 mm, spojena na kolonu CP-WAX 57 CB s unutarnjim promjerom od 50 m × 0,32 mm i debljinom filma od 0,2 μm (stabilizirani polietilen glikol). (Kolone su spojene korištenjem utisnutog konektora bez mrtvog volumena.)

▼B

Plin nositelj i tlak:	helij (65 kPa)
Temperatura kolone:	35 °C tijekom 10 min., 35 do 110 °C na 5 °C/min., 110 do 190 °C na 30 °C/min., zadržavanje na 190 °C tijekom 2 min.
Temperatura injektora:	260 °C
Temperatura detektora:	300 °C
Volumen injektiranja:	1 µl, razdjeljenje 55:1

3. Napunjena kolona (5 % CW 20M, Carbopak B), unutarnjeg promjera od 2 m × 2 mm.

Temperatura kolone:	65 °C tijekom 4 min., 65 do 140 °C na 10 °C/min., zadržavanje na 140 °C tijekom 5 min., 140 do 150 °C na 5 °C/min., zadržavanje na 150 °C tijekom 3 min.
Temperatura injektora:	65 °C
Temperatura detektora:	200 °C
Volumen injektiranja:	1 µl

7. **Uzorkovanje i uzorci**

7.1. Laboratorijski uzorak

Alkoholna jakost svakog uzorka se mjeri po primitku (6.1.).

8. **Postupak (koji se koristi za validiranu metodu)**

8.1. Količina za ispitivanje

8.1.1. Izvaže se odgovarajuća zatvorena posuda za vaganje i zabilježi masa.

8.1.2. U posudu se pipetira 9 ml laboratorijskog uzorka i zabilježi masa (M_{UZORAK}).

8.1.3. Doda se 1 ml otopine standarda E (5.14.5.) i zabilježi masa (M_{IS}).

8.1.4. Materijal za ispitivanje se dobro protrese (najmanje 20 puta). Uzorci se moraju čuvati na temperaturi nižoj 5 °C prije analize kako bi se smanjio gubitak hlapljenjem.

8.2. Slijepa proba

8.2.1. Uporabom vage s mogućnošću očitavanja na četiri decimalna mjesta (6.2.) izvaže se odgovarajuća zatvorena posuda za vaganje i zabilježi masa.

8.2.2. U posudu se pipetira 9 ml 400 ml/l otopine etanola (5.13.) i zabilježi masa.

8.2.3. Doda se 1 ml otopine standarda E (5.14.5.) i zabilježi masa.

8.2.4. Materijal za ispitivanje se dobro protrese (najmanje 20 puta). Uzorci se moraju čuvati na temperaturi nižoj 5 °C prije analize kako bi se smanjio gubitak hlapljenjem.

8.3. Uvodno ispitivanje

Ubrizga se standardna otopina C (5.14.3.) kako bi se osiguralo odvajanje svih analita uz minimalnu rezoluciju od 1,3 (osim 2-metil butan-1-ola i 3-metil butan-1-ola).

▼B

8.4. Kalibriranje

Kalibriranje se mora provjeriti sljedećim postupkom. Osigura se linearnost odziva detektora sukcesivnom analizom u triplikatu svake otopine standarda za provjeru linearnosti (5.14.6.) koja sadrži interni standard (IS). Iz površina vršaka integratora ili visina vršaka za svako ubrizgavanje izračuna se omjer R za svaki srodni spoj i napravi grafički prikaz R prema omjeru koncentracije srodnog spoja i internog standarda (IS), C. Treba se dobiti linearna krivulja, s koeficijentom korelacije od najmanje 0,99.

$$R = \frac{\text{Površina ili visina vrška srodnog spoja}}{\text{Površina ili visina vrška IS}}$$

$$C = \frac{\text{Koncentracija srodnog spoja } (\mu g/g)}{\text{Koncentracija IS } (\mu g/g)}$$

8.5. Određivanje

Ubrizga se standardna otopina C (5.14.3.) i 2 otopine standarda kontrole kvalitete (5.14.7.). Slijede nepoznati uzorci (pripremljeni u skladu sa 8.1. i 8.2.), umetanjem jednog standarda kontrole kvalitete na svakih 10 uzoraka kako bi se osigurala analitička stabilnost. Injektira se jedna standardna otopina C (5.14.3.) nakon svakih 5 uzoraka.

9. **Izračunavanje**

Može se koristiti automatizirani sustav za obradu podataka, pod uvjetom da se podaci mogu provjeriti na temelju načela koja su opisana u donjoj metodi.

Izmjere se visine ili površine vršaka za srodni spoj i vrški internog standarda.

9.1. Računanje faktora odziva detektora.

Iz kromatograma s ubrizganom otopinom standarda C (5.14.3.) izračunaju se faktori odziva detektora za svaki srodni spoj pomoću sljedeće jednadžbe (1).

$$(1)\ \text{Faktor odziva detektora} = \frac{\text{Površina ili visina vrška IS}}{\text{Površina ili visina vrška srodnog spoja}} \times \frac{\text{Konc. srodnog spoja } (\mu g/g)}{\text{Konc. IS } (\mu g/g)}$$

gdje je:

IS	=	interni standard
Konc. srodnog spoja	=	koncentracija srodnog spoja u otopini C (5.14.3.)
Konc. IS	=	koncentracija internog standarda u otopini C (5.14.3.).

9.1.2. Analiza uzorka

Korištenjem dolje prikazane jednadžbe (2) izračuna se koncentracija svakog srodnog spoja u uzorcima.

$$(2)\ \text{Koncentracije srodnog spoja, } (\mu g/g) =$$

$$\frac{\text{Površina ili visina vrška srodnog spoja}}{\text{Površina ili visina vrška IS}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{(M_{UZORAK})\ (g)} \times \text{Konc. IS } (\mu g/g) \times RF$$

▼B

gdje je:

(M_{UZORAK}) = masa uzorka (8.1.2.);

M_{IS} = masa internog standarda (8.1.3.);

Konc. IS = koncentracija internog standarda u otopini E (5.14.5.);

RF = faktor odgovora izračunan primjenom jednadžbe 1.

9.1.3. Analiza otopine standarda za provjeru rada sustava

Korištenjem jednadžbe (3) dane dolje, izračuna se postotak iskorištenja ciljne vrijednosti za svaki srodni spoj u standardima za provjeru rada sustava (5.14.7.):

$$(3)\ \%\ \text{iskorištenja uzorka za provjeru rada sustava} = \frac{\text{koncentracija analita u standardu za provjeru rada sustava}}{\text{koncentracija analita u otopini D}} \times 100$$

Koncentracija analita u standardu za provjeru rada sustava izračunava se primjenom jednadžbi (1) i (2) gore.

9.2. Konačni prikaz rezultata

Rezultati se preračunaju iz μ/g u g na 100 litara apsolutnog alkohola za uzorke primjenom jednadžbe (4):

$$(4)\ \text{Koncentracija u g na 100 litara apsolutnog alkohola} = \text{Konc.}\ (\mu g/g) \times \rho \times 10/(\text{jakost}\ (\text{vol.}\ \%) \times 1\ 000)$$

gdje je

ρ = gustoća u kg/m^3.

Rezultati se izražavaju do 3 značajne znamenke i najviše jednog decimalnog mjesta, npr. 11,4 g na 100 l apsolutnog alkohola.

10. **Osiguranje kakvoće i kontrola (korišteni za validiranu metodu)**

Primjenom gore navedene jednadžbe (2) izračuna se koncentracija svakog srodnog spoja u otopinama standarda za provjeru sustava koje su pripremljene postupkom opisanim pod točkama od 8.1.1. do 8.1.4. Primjenom jednadžbe (3) izračuna se postotak iskorištenja ciljne vrijednosti. Ako su analitički rezultati unutar ± 10 % njihovih teoretskih vrijednosti za svaki srodni spoj, analiza se može nastaviti. Ako nisu, mora se istražiti uzrok odstupanja te poduzeti potrebne korektivne mjere.

11. **Svojstva provođenja metode (preciznost)**

Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja: sljedeće tablice daju vrijednosti za sljedeće spojeve: etanal, etil acetat, acetal, ukupni etanal, metanol, butan-2-ol, propan-1-ol, butan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-butan-1-ol i 3-metil-butan-1-ol.

Sljedeći podaci su dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	etanal

▼B

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	28	26	27	27	28
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	2	4	3	3	2
Broj prihvaćenih rezultata	56	52	54	54	56
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4	28,6
				13,8 (*)	52,2 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Granica ponovljivosti (r) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Granica obnovljivosti (R) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch: dvostruko slijepe probe
C grapa: dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	etil acetat

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	24	24	25	24	24
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	2	2	1	2	2
Broj prihvaćenih rezultata	48	48	50	48	48
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5	99,1
				91,8 (*)	117,0 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Granica ponovljivosti (r) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3

▼B

Uzorci	A	B	C	D	E
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Granica obnovljivosti (R) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch; dvostruko slijepe probe
C grapa: dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	acetal

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	20	21	22	17	21
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	4	3	2	4	3
Broj prihvaćenih rezultata	40	42	44	34	42
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36	15,1
				6,60 (*)	28,3 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Granica ponovljivosti (r) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Granica obnovljivosti (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch: dvostruko slijepe probe
C grapa: dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

▼B

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	ukupni etanal

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	23	19	22	21	22
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	1	5	2	3	2
Broj prihvaćenih rezultata	46	38	44	42	44
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8 (*)	32,7 61,8 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Granica ponovljivosti (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Granica obnovljivosti (R) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch: dvostruko slijepe probe
C grapa: dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	metanol

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	26	27	27	28	25
Broj odbacivanja negativnih vrijednosti (laboratoriji)	4	3	3	1	4
Broj prihvaćenih rezultata	52	54	54	56	50
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)

▼B

Uzorci	A	B	C	D	E
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Granica ponovljivosti (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Granica obnovljivosti (R) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch: dvostruko slijepe probe
C grapa: dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	4
Analit	butan-2-ol

Uzorci	A	B	C	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	21	27	29	22
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	4	3	1	3
Broj prihvaćenih rezultata	42	54	58	44
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Granica ponovljivosti (r) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Granica obnovljivosti (R) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch; dvostruko slijepe probe
C grapa; dvostruko slijepe probe
E rum; razine razdiobe (*)

▼B

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	propan-1-ol

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	29	27	27	29	29
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	2	4	3	2	2
Broj prihvaćenih rezultata	58	54	54	58	58
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Granica ponovljivosti (r) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Granica obnovljivosti (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch; dvostruko slijepe probe
C grapa; dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	propan-1-ol

Uzorci	A	B	C
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	20	22	22
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	4	4	6
Broj prihvaćenih rezultata	40	44	44
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	0,43	0,20	0,43

▼B

Uzorci	A	B	C
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Granica ponovljivosti (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Relativna standarda devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Granica obnovljivosti (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch; dvostruko slijepe probe
C grapa; dvostruko slijepe probe (*)

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	2-metil propan-1-ol

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	28	31	30	26	25
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	3	0	1	5	6
Broj prihvaćenih rezultata	56	62	60	52	50
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8 (*)	133,87 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Granica ponovljivosti (r) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Relativna standarda devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Granica obnovljivosti (R) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch; dvostruko slijepe probe
C grapa; dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

▼B

Godina laboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	2-metil-butan-1-ol

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	25	26	25	27	25
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	3	2	3	1	2
Broj prihvaćenih rezultata	50	52	50	54	50
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1	39,5
				45,2 (*)	61,5 (*)
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Granica ponovljivosti (r) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Granica obnovljivosti (R) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch; dvostruko slijepe probe
C grapa; dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1997.
Broj laboratorija	32
Broj uzoraka	5
Analit	3-metil-butan-1-ol

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija preostalih nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	23	23	24	27	21
Broj odbacivanja ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	5	5	4	1	6
Broj prihvaćenih rezultata	46	46	48	54	42
Srednja vrijednost ($\overline{\times}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2	212,3
				120,4 (*)	245,6 (*)

▼B

Uzorci	A	B	C	D	E
Standardna devijacija ponovljivosti (S_r) µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Relativna standardna devijacija ponovljivosti (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Granica ponovljivosti (r) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Standardna devijacija obnovljivosti (S_R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Relativna standardna devijacija obnovljivosti (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Granica obnovljivosti (R) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Vrste uzoraka
A brandy; dvostruko slijepe probe
B kirsch: dvostruko slijepe probe
C grapa; dvostruko slijepe probe
D viski; razine razdiobe (*)
E rum; razine razdiobe (*)

▼M1

V. ANETOL. ODREĐIVANJE TRANS-ANETOLA U ALKOHOLNIM PIĆIMA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. Područje primjene

Ova je metoda prikladna za određivanje trans-anetola u alkoholnim pićima s aromom anisa primjenom kapilarne plinske kromatografije.

2. Referentni standardi

ISO 3696:1987 Voda za uporabu u analitičkom laboratoriju – Specifikacije i metode ispitivanja.

3. Načelo rada

Koncentracija trans-anetola alkoholnog pića određuje se plinskom kromatografijom (GC). Ista količina internog standarda, npr. 4-alilanizola (estragola) kada estragol nije prirodno prisutan u uzorku, dodaje se uzorku za ispitivanje i referentnoj otopini trans-anetola poznate koncentracije te se oba razrijede pomoću 45 %-tne otopine etanola i injektiraju izravno u sustav za plinsku kromatografiju (GC). Prije pripreme uzoraka i analize likera koji sadrže veće količine šećera potrebna je ekstrakcija.

4. Reagensi i materijali

Tijekom analize koriste se samo reagensi čija je čistoća najmanje 98 %. Mora se koristiti voda čiji je stupanj kakvoće najmanje 3 prema definiciji standarda ISO 3696.

Referentne kemikalije trebaju se čuvati na hladnom (na 4 °C) i tamnom mjestu, u aluminijskim spremnicima ili u bočicama za reagense od obojenog (jantarnog) stakla. Poželjno je da zatvarači imaju aluminijsku brtvu. Potrebno je „otopiti” trans-anetol iz kristalnog stanja prije uporabe, ali u tom slučaju njegova temperatura nikada ne smije prijeći 35 °C.

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

4.2. 1-metoksi-4-(1-propenil) benzen; (trans-anetol) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-alilanizol, (estragol) (CAS 140-67-0), preporučeni interni standard (IS)

4.4. Etanol 45 % vol.

Doda se 560 g destilirane vode u 378 g etanola 96 % vol.

4.5. Priprema standardnih otopina

Sve standardne otopine moraju se čuvati na sobnoj temperaturi (od 15 do 35 °C), na tamnom mjestu, u aluminijskim spremnicima ili u bočicama za reagense od obojenog (jantarnog) stakla. Poželjno je da zatvarači imaju aluminijsku brtvu.

Trans-anetol i 4-alilanizol praktički su netopivi u vodi te je stoga neophodno otopiti trans-anetol i 4-alilanizol u određenoj količini 96 %-tnog etanola (4.1.) prije dodavanja 45 %-tnog etanola (4.4.).

Radne otopine moraju se pripremati svježe svaki tjedan.

4.5.1. Standardna otopina A

Radna otopina trans-anetola (koncentracija: 2 g/L)

Odvagne se 40 mg trans-anetola (4.2) u odmjernu tikvicu od 20 ml (ili 400 mg u 200 ml itd.). Doda se određena količina 96 %-tnog etanola (4.1), nadopuni do oznake s 45 %-tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

▼M1

4.5.2. Interna standardna otopina B

Radna interna standardna otopina, npr. estragol (koncentracija: 2 g/L)

Odvagne se 40 mg estragola (4.3) u odmjernu tikvicu od 20 ml (400 mg u 200 ml itd.). Doda se određena količina 96 %-tnog etanola (4.1), nadopuni do oznake 45 %-tnim etanolom (4.4) te dobro promiješa.

4.5.3. Otopine koje se koriste za provjeru linearnosti odziva plamenog ionizacijskog detektora (FID)

Linearnost odziva plamenog ionizacijskog detektora (FID-a) mora se provjeriti za analizu, uzimajući u obzir raspon koncentracija trans-anetola u alkoholnim pićima od 0 g/L do 2,5 g/L. U postupku analize, nepoznati uzorci alkoholnih pića koji se moraju analizirati razrijede se 10 puta (8.3.). Za uvjete analize opisane u metodi, radne otopine koje odgovaraju koncentracijama od 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 i 0,25 g/L trans-anetola u uzorku koji se mora analizirati pripreme se kako slijedi: uzme se 0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5 ml radne otopine A (4.5.1.) i pipetira u odvojene odmjerne tikvice od 20 ml; u svaku se tikvicu pipetira 2 ml interne standardne otopine B (4.5.2.), nadopuni do oznake 45 % -tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

Otopine slijepe probe (8.4.) koriste se kao 0 g/L otopina.

4.5.4. Standardna otopina C

Uzme se 2 ml standardne otopine A (4.5.1.) i pipetira u odmjernu tikvicu od 20 ml, zatim se doda 2 ml interne standardne otopine B (4.5.2.), dopuni do oznake 45 % -tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

5. **Aparatura i oprema**

5.1. Kapilarni plinski kromatograf opremljen plamenim ionizacijskim detektorom (FID) i integratorom ili drugim sustavom za obradu podataka koji mjeri visine ili površine pikova te uređajem za automatsko uzorkovanje ili potrebnom opremom za ručno injektiranje uzoraka.

5.2. Injektor sa i bez razdjeljenja

5.3. Kapilarni stupac, na primjer:

Dužina: 50 m

Unutarnji promjer: 0,32 mm

Debljina filma: 0,2 μm

Stacionarna faza: FFAP – modificirani TPA polietilen glikol umreženi porozni polimer.

5.4. Uobičajena laboratorijska oprema: odmjerno stakleno posuđe razine A, analitička vaga (preciznost: ± 0,1 mg).

6. **Kromatografski uvjeti**

Vrsta i dimenzije stupca te uvjeti plinske kromatografije moraju biti takvi da su anetol i interni standard odvojeni jedan od drugog i od svih interferirajućih tvari. Uobičajeni uvjeti za stupac iz primjera u 5.3. su:

6.1. Plin nosilac: analitički helij

6.2. Brzina protoka: 2 ml/min

6.3. Temperatura injektora: 250 °C

6.4. Temperatura detektora: 250 °C

6.5. Temperatura peći: izotermna, 180 °C, vrijeme rada 10 minuta

6.6. Volumen injektiranja:1 μL, razdjeljenje 1:40.

▼M1

7. **Uzorci**

Uzorci se moraju čuvati na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svjetla i hladnoće.

8. **Postupak**

8.1. Pretraživanje uzorka na estragol

Za provjeru je li estragol prirodno prisutan u uzorku, mora se napraviti analiza slijepe probe bez dodatka bilo kojeg internog standarda. Ako je estragol prirodno prisutan, tada se mora odabrati neki drugi interni standard (na primjer, mentol).

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2 ml uzorka, nadopuni do oznake 45 %-tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

8.2. Priprema nepoznatih uzoraka

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2 ml uzorka, zatim se doda 2 ml interne standardne otopine B (4.5.2.), nadopuni do oznake 45 %-tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

8.3. Slijepa proba

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2 ml interne standardne otopine B (4.5.2.), nadopuni do oznake 45 %-tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

8.4. Ispitivanje linearnosti

Prije početka analize mora se provjeriti linearnost odziva plamenog ionizacijskog detektora (FID-a) sukcesivnom trostrukom analizom svake standardne otopine za provjeru linearnosti (4.5.3.).

Iz površine pikova ili visine pikova integratora za svako se injektiranje napravi grafički prikaz koncentracije njihove matične otopine u g/L prema omjeru R za svaku.

R = visina ili površina pika za trans-anetol podijeljena s visinom ili površinom pika za estragol.

Mora se dobiti linearna krivulja.

8.5. Određivanje

Ubrizga se otopina slijepe probe (8.3.), zatim standardna otopina C (4.5.4.) i jedna od standardnih otopina za provjeru linearnosti (4.5.3.) koja će djelovati kao uzorak za kontrolu kakvoće (može se odabrati s obzirom na vjerojatnu koncentraciju trans-anetola u nepoznatom uzorku) te pet nepoznatih uzoraka (8.2.); umetne se uzorak za provjeru linearnosti (kontrolu kakvoće) nakon svakih pet nepoznatih uzoraka kako bi se osigurala analitička stabilnost.

9. **Računanje faktora odziva**

Mjere se ili površine pika (pomoću integratora ili drugog sustava za obradu podataka) ili visine pika (ručna integracija) za pikove trans-anetola i internog standarda.

9.1. Računanje faktora odziva (RF_i)

Faktor odziva računa se kako slijedi

$RF_i = (C_i/\text{površina ili visina}_i)*(\text{površina ili visina}_{is}/C_{is})$

gdje je:

C_i koncentracija trans-anetola u standardnoj otopini A (4.5.1.)

C_{is} koncentracija internog standarda u standardnoj otopini B (4.5.2.)

▼M1

površina$_i$ površina (ili visina) pika trans-anetola

površina$_{is}$ površina (ili visina) pika internog standarda

RF_i se računa iz pet uzoraka otopine C (4.5.4.).

9.2. Analiza otopina za ispitivanje linearnosti odziva

Ubrizgaju se otopine za ispitivanje linearnosti odziva (4.5.3.).

9.3. Analiza uzorka

Ubrizga se otopina nepoznatog uzorka (8.2.).

10. **Računanje rezultata**

Formula za izračun koncentracije trans-anetola je sljedeća:

$c_i = C_{is}$ * (površina ili visina$_i$/površina ili visina$_{is}$)*RF_i

gdje je:

c_i	nepoznata koncentracija trans-anetola
C_{is}	koncentracija internog standarda u nepoznatoj tvari (4.5.2.)
Površina ili visina$_i$	površina ili visina pika trans-anetola
Površina ili visina$_{is}$	površina ili visina pika internog standarda
RF_i	koeficijent odziva (izračunan kao pod 9.1.)

Koncentracija trans-anetola izražava se u gramima po litri, na jednu decimalu.

11. **Osiguranje i kontrola kakvoće**

Kromatogrami moraju biti takvi da su anetol i interni standard odvojeni jedan od drugog i od svih interferirajućih tvari. Vrijednost RF_i izračuna se iz rezultata za pet injektiranja otopine C (4.5.4.). Ako je koeficijent varijacije (CV %=(standardno odstupanje/srednja vrijednost)*100)) unutar plus ili minus 1 %, prosječna vrijednost RF_i je prihvatljiva.

Gornji se izračun mora koristiti za računanje koncentracije trans-anetola u uzorku koji je odabran za kontrolu kakvoće iz otopina za kontrolu linearnosti (4.5.3.).

Ako su srednji izračunati rezultati iz analize otopina za kontrolu linearnosti koje su odabrane za uzorke interne kontrole kakvoće (IQC) unutar plus ili minus 2,5 % njihove teoretske vrijednosti, tada se mogu prihvatiti rezultati za nepoznate uzorke.

12. **Obrada uzorka alkoholnog pića koji sadrži veću količinu šećera i uzorka likera prije analize plinskom kromatografijom**

Ekstrakcija alkohola iz alkoholnog pića koje sadrži veću količinu šećera kako bi se mogla odrediti koncentracija trans-anetola primjenom kapilarne plinske kromatografije.

12.1. Načelo rada

Uzme se alikvot uzorka likera i doda mu se interni standard čija je koncentracija slična koncentraciji analita (trans-anetola) u likeru. Tome se doda natrijev fosfat dodekahidrat i bezvodni amonijev sulfat. Dobivena se mješavina dobro promiješa i ohladi, nastaju dva sloja, a gornji alkoholni sloj se ukloni. Uzme se alikvot tog alkoholnog sloja i razrijedi 45 %-tnom otopinom etanola (4.4.) (Napomena: u ovoj se fazi ne dodaje nijedan interni standard, budući da je već dodan). Dobivena se otopina analizira plinskom kromatografijom.

▼M1

12.2. Reagensi i materijali

Tijekom ekstrakcije se koriste samo reagensi čija je čistoća veća od 99 %.

12.2.1. Amonijev sulfat, bezvodni (CAS 7783-20-2).

12.2.2. Natrijev fosfat, dibazični, dodekahidrat (CAS 10039-32-4).

12.3. Aparatura i oprema

Konusne tikvice, tikvice za odjeljivanje, hladnjak.

12.4. Postupak

12.4.1. Pretraživanje uzorka na estragol

Kako bi bili sigurni da estragol nije prirodno prisutan u uzorku, mora se izvršiti ekstrakcija slijepe probe (12.6.2.) i analiza bez dodavanja bilo kojeg internog standarda. Ako je estragol prirodno prisutan, tada se mora odabrati neki drugi interni standard.

12.4.2. Ekstrakcija

U konusnu se tikvicu pipetira 5 ml 96 %-tnog etanola (4.1.); u ovu se tikvicu odvagne 50 mg internog standarda (4.3.) i doda 50 ml uzorka. Doda se 12 g amonijeva sulfata, bezvodnog (12.2.1.) i 8,6 g dibazičnog natrijeva fosfata, dodekahidrata (12.2.2.). Konusna tikvica se začepi.

Tikvica se mućka najmanje 30 minuta. Može se koristiti i mehanički uređaj za mućkanje, ali ne i magnetni mješač obložen teflonom, jer teflon upija određenu količinu analita. Dodane soli neće se potpuno otopiti.

Začepljena se tikvica stavi u hladnjak ($T < 5$ °C) na najmanje 2 sata.

Nakon toga trebaju nastati dva odvojena tekuća sloja i čvrsti ostatak. Alkoholni sloj treba biti bistar; ako nije, stavi se ponovno u hladnjak dok ne postane bistar.

Kada alkoholni sloj postane bistar, pažljivo se uzme alikvot (npr. 10 ml) bez narušavanja vodenog sloja, stavi u bočicu od jantarnog stakla i zatvori sigurnosnim zatvaračem.

12.4.3. Priprema ekstrahiranog uzorka za analizu

Pusti se da ekstrakt (12.4.2.) dosegne sobnu temperaturu.

Uzme se 2 ml alkoholnog sloja ekstrahiranog uzorka regulirane temperature i pipetira u odmjernu tikvicu od 20 ml, nadopuni do oznake 45 %-tnim etanolom (4.4.) i dobro promiješa.

12.5. Određivanje

Slijedi se postupak opisan pod 8.5.

12.6. Računanje rezultata

Za računanje rezultata koristi se sljedeća formula:

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

gdje je:

m_{is} masa uzetog internog standarda (4.3.) (12.4.2.) (u miligramima)

V volumen nepoznatog uzorka (50 ml)

RF_i faktor odziva (9.1.)

površina_i površina pika trans-anetola

površina_{is} površina pika internog standarda

Rezultati se izražavaju u gramima po litri, na jednu decimalu.

▼M1

12.7. Kontrola i osiguranje kakvoće

Slijedi se postupak opisan pod 11. gore.

13. **Svojstva metode (preciznost)**

Statistički rezultati interlaboratorijskog ispitivanja:

Sljedeće tablice daju vrijednosti za anetol.

Sljedeći su podaci dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina interlaboratorijskog ispitivanja	1998.
Broj laboratorija	16
Broj uzoraka	10
Analit	anetol

Pastis:

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Broj zadržanih laboratorija nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	15	15	15	13	16	16
Broj odstupanja (laboratorija)	1	1	1	3	—	—
Broj prihvaćenih rezultata	30	30	30	26	16	16
Srednja vrijednost g/L	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Standardno odstupanje ponovljivosti (S_t) g/L	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Relativno standardno odstupanje ponovljivosti (RSD_t) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Granica ponovljivosti (r) g/L	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Standardno odstupanje obnovljivosti (S_R) g/L	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Relativno standardno odstupanje obnovljivosti (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Granica obnovljivosti (R) g/L	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Vrste uzoraka

A pastis, slijepe probe u duplikatu

B pastis, slijepe probe u duplikatu

C pastis, slijepe probe u duplikatu

D pastis, slijepe probe u duplikatu

E pastis, jednostruki duplikati

F pastis, jednostruki duplikati

▼**M1**

Druga alkoholna pića s aromom anisa:

Uzorci	G	H	I	J
Broj zadržanih laboratorija nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	16	14	14	14
Broj odstupanja (laboratorija)	—	2	1	1
Broj prihvaćenih rezultata	32	28	28	28
Srednja vrijednost g/L	0,778 0,530*	1,742	0,351	0,599
Standardno odstupanje ponovljivosti (S_t) g/L	0,020	0,012	0,013	0,014
Relativno standardno odstupanje ponovljivosti (RSD_t) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Granica ponovljivosti (r) g/L	0,056	0,033	0,038	0,038
Standardno odstupanje obnovljivosti (S_R) g/L	0,031	0,029	0,021	0,030
Relativno standardno odstupanje obnovljivosti (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Granica obnovljivosti (R) g/L	0,088	0,080	0,058	0,084

Vrste uzoraka

G ouzo, razdijeljene razine(*)

H anis, slijepe probe u duplikatu

I liker a aromom anisa, u duplikatu

J liker a aromom anisa, u duplikatu.

▼M1

VI. GLICIRIZNA KISELINA. ODREĐIVANJE GLICIRIZNE KISELINE PRIMJENOM VISOKODJELOTVORNE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE

1. **Svrha**

Ova metoda je prikladna za određivanje glicirizne kiseline u alkoholnim pićima s aromom anisa primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC). Uredba (EEZ) br. 1576/89 određuje da svako alkoholno piće s aromom anisa koje se naziva „pastis" mora sadržavati između 0,05 i 0,5 g glicirizne kiseline po litri.

2. **Referentni standardi**

ISO 3696: 1987 Voda za uporabu u analitičkom laboratoriju – Specifikacije i metode ispitivanja.

3. **Načelo rada**

Koncentracija glicirizne kiseline se određuje pomoću visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) s UV detekcijom. Standardna otopina i probni uzorak filtriraju se i odvojeno injektiraju izravno u sustav HPLC-a.

4. **Reagensi i materijali**

Tijekom analize, koriste se samo reagensi za HPLC, apsolutni etanol i voda čiji stupanj kakvoće iznosi 3 prema definiciji standarda ISO 3696.

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

4.2. Amonij glicirizinat, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (amonijeva sol glicirizne kiseline)

(Relativna molekulska masa 839,98) (CAS 53956-04-0): čistoća najmanje 90 %

(Relativna molekulska masa: glicirizinska kiselina 822,94).

4.3. Ledena octena kiselina, CH_3COOH (CAS 64-19-7).

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

4.5. Etanol 50 % vol.

Za 1 000 ml na 20 °C:

— 96 %-tni etanol (4.1.): 521 ml

— voda (2.0.): 511 ml.

4.6. Priprema HPLC otopina za eluciju

4.6.1. Otapalo za eluciju A (primjer)

80 dijelova (po volumenu) vode (2.0.)

20 dijelova (po volumenu) octene kiseline (4.3.).

Otapalo za eluciju degazira se u trajanju od pet minuta.

Napomena: Ako voda koja se koristi nije mikrofiltrirana, preporučuje se filtrirati pripremljeno otapalo za eluciju na filteru za organska otapala s veličinom pora koja je manja ili jednaka 0,45 μm.

4.6.2. Otapalo za eluciju B

Metanol (4.4.).

4.7. Priprema standardnih otopina

Sve standardne otopine moraju se svježe pripremiti nakon dva mjeseca.

▼M1

4.7.1. Referentna otopina C

U odmjernu tikvicu od 100 ml odvagne se 25 mg amonijeva glicirizinata (4.2) s točnošću od 0,1 mg. Doda se etanol 50 % vol. (4.5.) i otopi amonijev glicirizinat. Kad je otopljen, dopuni se do oznake etanolom 50 % vol. (4.5.).

Filtrira se kroz filtar za organska otapala.

4.7.2. Standardne otopine koje se koriste za provjeru linearnosti odziva uređaja

Radna otopina od 1,0 g/L se pripremi odvagom s točnošću od 0,1 mg, 100 mg amonijeva glicirizinata u odmjernu tikvicu od 100 ml. Doda se etanol 50 % vol. (4.5.) i otopi amonijev glicirizinat. Kad je otopljen, nadopuni se do oznake etanolom 50 % vol. (4.5.).

Pripreme se najmanje četiri druge otopine koje odgovaraju 0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 g/L amonijeva glicirizinata pipetiranjem 5 ml, 10 ml, 25 ml, odnosno 50 ml radne otopine masene koncentracije 1,0 g/L u odvojene odmjerne tikvice od 100 ml. Nadopuni se do oznake etanolom 50 % vol. (4.5.) i dobro promiješa.

Sve se otopine filtriraju kroz filtar za organska otapala.

5. **Aparatura i oprema**

5.1. Sustav za odjeljivanje

5.1.1. Visokodjelotvorni tekućinski kromatograf

5.1.2. Sustav pumpi koji omogućuje postizanje i održavanje stalne ili programirane brzine protoka s visokom preciznošću.

5.1.3. UV spektrofotometar: mora biti postavljen na 254 nm.

5.1.4. Sustav za degaziranje otapala.

5.2. Računalni integrator ili uređaj za snimanje čiji rad je kompatibilan s ostatkom sustava.

5.3. Kolona (primjer):

Materijal: nehrđajući čelik ili staklo

Unutarnji promjer: 4 do 5 mm

Duljina: 100 do 250 mm

Stacionarna faza: umreženi silicijev dioksid s (poželjno sferičnom) oktadecilnom funkcijskom grupom (C18), najveća veličina čestica: 5 μm.

5.4. Laboratorijska oprema

5.4.1. Analitička vaga s preciznošću očitavanja od 0,1 mg

5.4.2. Odmjerno stakleno posuđe razine A

5.4.3. Mirkomembranski filtri za male volumene.

6. **Kromatografski uvjeti**

6.1. Svojstva elucije (primjer)

— brzina protoka: 1 ml/minuta,

— otapalo A = 30 %,

— otapalo B = 70 %.

6.2. Detekcija

— UV = 254 nm

▼M1

7. **Postupak**

7.1. Priprema uzorka alkoholnog pića

Filtrira se, ako je potrebno, kroz filtar za organska otapala (promjer pora: 0,45 μm).

7.2. Određivanje

Kad se stabiliziraju kromatografski uvjeti,

— injektira se 20 μL referentne otopine C (4.7.1),

— injektira se 20 μL otopine uzorka,

— usporede se dva kromatograma. Identificiraju se pikovi glicirizne kiseline na temelju njihovih vremena retencije. Izmjere se njihove površine (ili visine) i izračuna koncentracija u g/L na dvije decimale primjenom sljedeće jednadžbe:

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

gdje je:

c koncentracija u gramima po litri glicirizne kiseline u alkoholnom piću koje se analizira

C koncentracija u gramima po litri amonijeva glicirizinata u referentnoj otopini

h površina (ili visina) pika glicirizne kiseline alkoholnog pića koje se analizira

H površina (ili visina) pika glicirizne kiseline referentne otopine

P čistoća referentnog amonijeva glicirizinata (u %)

823 masa jednog mola glicirizne kiseline

840 masa jednog mola amonijeva glicirizinata.

8. **Svojstva metode (preciznost)**

Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja:

sljedeće tablice daju vrijednosti za gliciriznu kiselinu.

Sljedeći su podaci dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1998.
Broj laboratorija	16
Broj uzoraka	5
Analit	glicirizna kiselina

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj zadržanih laboratorija nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	13	14	15	16	16
Broj odstupanja (laboratorija)	3	2	1	—	—
Broj prihvaćenih rezultata	26	28	30	32	32
Srednja vrijednost g/L	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493

▼**M1**

Uzorci	A	B	C	D	E
Standardno odstupanje ponovljivosti (S_t) g/L	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Relativno standardno odstupanje ponovljivosti (RSD_t) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Granica ponovljivosti (r) g/L	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Standardno odstupanje obnovljivosti (S_R) g/L	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Relativno standardno odstupanje obnovljivosti (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Granica obnovljivosti (R) g/L	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Vrste uzoraka

A pastis, slijepe probe u duplikatu

B pastis, razdijeljene razine (*)

C pastis, slijepe probe u duplikatu

D pastis, slijepe probe u duplikatu

E pastis, slijepe probe u duplikatu

▼M1

VII. KALKONI. VISOKODJELOTVORNA TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ZA PROVJERU PRISUSTVA KALKONA U PASTISU

1. **Svrha**

Ova je metoda prikladna za određivanje prisutnosti kalkona u alkoholnim pićima s aromom anisa. Kalkoni su prirodna bojila iz skupine flavonoida koji se nalaze u slatkom korijenu (*Glycyrrhiza glabra*).

Da bi se alkoholno piće s aromom anisa moglo zvati „pastis”, mora sadržavati kalkone (Uredba (EEZ) br. 1576/89).

2. **Referentni standardi**

ISO 3696: 1987 Voda za uporabu u analitičkom laboratoriju – Specifikacije i metode ispitivanja.

3. **Načelo rada**

Pripremi se referentna otopina ekstrakta slatkog korijena. Prisutnost ili odsutnost kalkona određuje se visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) s UV detekcijom.

4. **Reagensi i materijali**

Tijekom analize, koriste se samo reagensi HPLC čistoće. Etanol treba biti 96 % vol. Treba se koristiti samo voda čiji stupanj kakvoće iznosi 3 prema definiciji standarda ISO 3696.

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

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

4.3. Referentna tvar: *Glycyrrhiza glabra*: slatki korijen

Grubo mljeveni slatki korijen (*Glycyrrhiza glabra*). Prosječne dimenzije štapićastih čestica: dužina: 10 do 15 mm, debljina: 1 do 3 mm.

4.4. Natrijev acetat, CH_3COONa (CAS 127-09-3)

4.5. Ledena octena kiselina, CH_3COOH (CAS 64-19-7)

4.6. Priprema otopina

4.6.1. Etanol 50 % vol.

Za 1 000 ml na 20 °C:

— etanol 96 % vol. (4.1.): 521 ml

— voda (2.0.): 511 ml.

4.6.2. Otapalo A: acetonitril

Acetonitril (4.2.) analitičke čistoće za HPLC.

Degazira se.

4.6.3. Otapalo B: 0,1 M puferska otopina natrijeva acetata, pH 4,66.

U odmjernu se tikvicu odvagne 8,203 g natrijeva acetata (4.4.), doda 6,005 g ledene octene kiseline (4.5.) i nadopuni do 1 000 ml vodom (2.).

▼M1

5. **Priprema referentnog ekstrakta iz Glycyrrhiza glabra (4.3)**

5.1. Odvagne se 10 g mljevenog slatkog korijena (*Glycyrrhiza glabra)* (4.3.) i stavi u destilacijsku tikvicu s okruglim dnom

— doda se 100 ml etanola 50 % vol. (4.6.1.),

— pusti se da vrije u refluksu sat vremena,

— filtrira se. i

— filtrat se odloži za kasniju uporabu.

5.2. S filtra se skine ekstrakt slatkog korijena,

— stavi u destilacijsku tikvicu s okruglim dnom,

— doda se 100 ml etanola 50 % vol. (4.6.1.),

— pusti se da vrije u refluksu sat vremena,

— filtrira se. Filtrat se odloži za kasniju uporabu.

5.3. Ekstrakcija slatkog korijena mora se napraviti tri puta za redom.

5.4. Kombiniraju se tri filtrata.

5.5. Na rotacijskom isparivaču se ispari otapalo (iz 5.4.).

5.6. Pokupi se ostatni ekstrakt (iz 5.5.) sa 100 ml etanola 50 % vol. (4.6.1.).

6. **Aparatura i oprema**

6.1. Sustav za odjeljivanje.

6.1.1. Visokodjelotvorni tekućinski kromatograf.

6.1.2. Sustav pumpi koji omogućuje postizanje i održavanje stalne ili programirane brzine protoka pri visokom tlaku.

6.1.3. UV/VID spektrofotometar: mora biti postavljen na 254 i 370 nm.

6.1.4. Sustav za degaziranje otapala.

6.1.5. Peć s kolonom koja se može podesiti na temperaturu od 40 ± 0,1 °C.

6.2. Računalni integrator ili uređaj za snimanje čiji je rad kompatibilan s ostatkom sustava za odjeljivanje.

6.3. Kolona

Materijal: nehrđajući čelik ili staklo

Unutarnji promjer: 4 do 5 mm

Stacionarna faza: umreženi silicij dioksid s oktadecilnom funkcijskom grupom (C18), maksimalna veličina čestica: najviše 5 μm (umrežena faza).

6.4. Uobičajena laboratorijska oprema, uključujući:

6.4.1. analitičku vagu (preciznost: ± 0,1 mg);

6.4.2. uređaj za destilaciju s povratnim hladilom koji se sastoji od, na primjer:

— tikvice s okruglim dnom od 250 ml i standardnim spojem od ubrušenog stakla,

▼M1

— 30 cm dugog povratnog hladila, i

— izvora topline (bilo koja pirogena reakcija koja uključuje ekstrakt mora se izbjeći uporabom prikladnog sustava).

6.4.3. Rotacijski uređaj za isparivanje.

6.4.4. Filtracija (tj. lijevak Büchner).

6.5. Kromatografski uvjeti (primjer).

6.5.1. Svojstva elucije otapala A (4.6.2.) i B (4.6.3.):

— pomak s gradijenta 20/80 (V/V) na 50/50 (V/V) u 15 minuta,

— pomak s gradijenta 50/50 (V/V) na 75/25 (V/V) u pet minuta,

— jednaka jakost na 75/25 (V/V) tijekom 5 minuta,

— stabilizacija kolone između injektiranja,

— jednaka jakost na 20/80 (V/V) tijekom pet minuta.

6.5.2. Brzina protoka: 1 ml/minuta.

6.5.3. Podešavanja UV detektora:

detektor mora biti podešen na 370 nm za detekciju prisustva kalkona, a zatim na 254 nm za detekciju glicirizne kiseline.

Napomena: promjena valne duljine (s 370 nm na 254 nm) mora se izvršiti 30 sekundi prije početka pika elucije glicirizne kiseline.

7. **Postupak**

7.1. Priprema uzorka alkoholnog pića

Filtrira se kroz filtar za organska otapala (promjer pora: 0,45 μm).

7.2. Priprema ostatnog ekstrakta slatkog korijena (5.6.)

Prije analize napravi se razrjeđenje jedan u deset pomoću etanola 50 % vol. (4.6.1.).

7.3. Određivanje

7.3.1. Injektira se 20 μL pripremljenog ekstrakta slatkog korijena (7.2.). Analiza se vrši uz kromatografske uvjete opisane gore (6.5.).

7.3.2. Injektira se 20 μL uzorka (7.1) (uzorak alkoholnog pića s aromom anisa). Analiza se vrši uz kromatografske uvjete opisane gore (6.5).

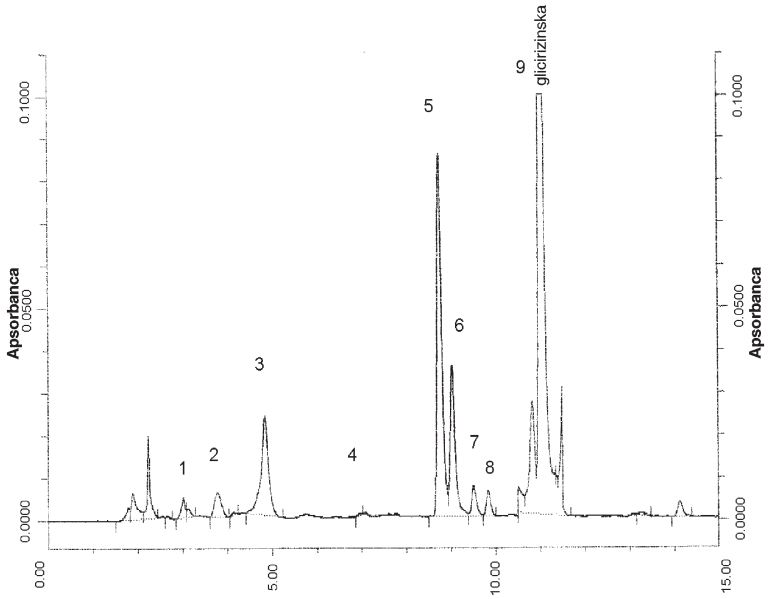
7.3.3. Usporede se dva kromatograma. Mora postojati velika sličnost između dva kromatograma u zoni izlaza kalkona (tijekom detekcije na 370 nm u uvjetima analize koji su opisani gore (vidjeti sliku 1.).

▼M1

8. **Svojstva kromatograma za pastis**

Slika 1

Kromatogram dobiven gore opisanom metodom, koji pokazuje prisutnost kalkona u „pastisu". Pikovi od 1. do 8. su kalkoni, a pik 9 je glicirizinska kiselina.



9. **Svojstva metode (preciznost)**

Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja:

sljedeća tablica daje rezultate za potvrđivanje prisustva ili odsustva kalkona u pastisu i alkoholnim pićima s aromom anisa.

Sljedeći podaci dobiveni su iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu su međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1998.
Broj laboratorija	14
Broj uzoraka	11
Analit	kalkoni

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Broj laboratorija zadržan nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	14	14	14	14	14	13
Broj odstupanja (laboratorija)	—	—	—	—	—	1 (*)
Broj prihvaćenih rezultata	28	14	14	28	28	26
Broj rezultata za prisutnost kalkona	28	14	14	0	28	0
Broj rezultata za odsutnost kalkona	0	0	0	28	0	26
Postotak točnih rezultata (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Nedosljedni rezultati između dvaju duplikata pripisani pogreški u uzorkovanju

▼M1

Uzorci	G	H	I	J	K
Broj laboratorija zadržan nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	14	14	14	14	14
Broj odstupanja (laboratorija)	—	—	—	—	—
Broj prihvaćenih rezultata	28	14	14	28	28
Broj rezultata za prisutnost kalkona	0	0	0	0	0
Broj rezultata za odsutnost kalkona	28	14	14	28	28
Postotak točnih rezultata (%)	100	100	100	100	100

Vrste uzoraka:

A pastis, slijepe probe u duplikatu

B pastis, jedan uzorak

C pastis, jedan uzorak

D „pastis” (ne sadrži kalkone), slijepe probe u duplikatu

E „pastis” (ne sadrži kalkone), slijepe probe u duplikatu

F liker s okusom anisa (ne sadrži kalkone), slijepe probe u duplikatu

G liker s okusom anisa (ne sadrži kalkone), slijepe probe u duplikatu

H ouzo (ne sadrži kalkone), jedan uzorak

I ouzo (ne sadrži kalkone), jedan uzorak

J anis (ne sadrži kalkone), slijepa proba u duplikatu

K „pastis” (ne sadrži kalkone), slijepa proba u duplikatu

▼M1

IX. ŽUMANJAK. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ŽUMANJKA U ALKOHOLNIM PIĆIMA – FOTOMETRIJSKA METODA

1. **Svrha**

Ova je metoda prikladna za određivanje koncentracije žumanjka u rasponu od 40 do 250 g/L u likeru od jaja i likeru s jajetom.

2. **Referentni standardi**

ISO 3696:1897 Voda za upotrebu u analitičkom laboratoriju – Specifikacije i metode ispitivanja.

3. **Načelo rada**

Fosforni spojevi topivi u etanolu koji se nalaze u žumanjku ekstrahiraju se i analiziraju fotometrijski kao molibdatni fosforni kompleksi.

4. **Reagensi i materijali**

4.1. Dvostruko destilirana voda

4.2. Dijatomejska zemlja

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

4.4. 15 %-tna otopina magnezijeva acetata (CAS 16674-78-5)

4.5. 10 %-tna sumporna kiselina (CAS 7664-93-9)

4.6. 1 N sumporne kiseline.

4.7. 0,16 g/L otopina kalijeva dihidrogen fosfata (CAS 778-77-0), KH_2PO_4

4.8. Reagens za određivanje fosfata:

otopi se 20 g amonijeva molibdata (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ u 400 ml vode na 50 °C;

u drugoj se posudi otopi 1 g amonijeva vanadata (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3, u 300 ml vruće vode, pusti da se ohladi, a zatim se doda 140 ml koncentrirane dušične kiseline (CAS 7697-37-2). Ohlađene se otopine pomiješaju u odmjernoj tikvici od 1 000 ml i nadopune se do oznake od 1 000 ml.

5. **Aparatura i oprema**

5.1. Konusna tikvica od 100 ml

5.2. Ultrazvučna kupelj (ili magnetski mješač)

5.3. Odmjerna tikvica od 100 ml

5.4. Vodena kupelj na 20 °C

5.5. Filtar (Whatman br. 4 ili ekvivalentni)

5.6. Porculanski (ili platinasti) lončić

5.7. Kipuća vodena kupelj

5.8. Vruća metalna ploča

5.9. Mufolna peć

5.10. Odmjerna tikvica od 50 ml

5.11. Odmjerna tikvica od 20 ml

5.12. Spektrofotometar podešen na 420 nm

5.13. Kiveta od 1 cm.

▼M1

6. **Uzorci**

Uzorci se skladište na sobnoj temperaturi prije analize.

7. **Postupak**

7.1. Priprema uzorka

7.1.1. U konusnu tikvicu od 100 ml odvagne se 10 g uzorka (5.1.).

7.1.2. Postupno se uz miješanje doda 70 ml etanola (4.3.) u malim obrocima i stavi u ultrazvučnu kupelj (5.2.) na 15 minuta (ili se mješavina miješa magnetskim mješačem (5.2.) 10 minuta na sobnoj temperaturi).

7.1.3. Sadržaj tikvice se prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml (5.3.) s ispircima etanola (4.3.). Do kalibracijske oznake dopuni se etanolom (4.3), a tikvice se stave u vodenu kupelj na 20 °C (5.4.). Do kalibracijske oznake se dopuni na 20 °C.

7.1.4. Doda se manja količina dijatomejske zemlje (4.2.) i filtrira (5.5.) te se odbaci prvih 20 ml.

7.1.5. Prelije se 25 ml filtrata u porculanski (ili platinasti) lončić (5.6.). Filtrat se tada mora koncentrirati blagim isparavanjem u kipućoj vodenoj kupelji (5.7.) uz dodatak 5 ml 15 %-tne otopine magnezijeva acetata (4.4.).

7.1.6. Lončići se stave na vruću metalnu ploču (5.8.) i zagrijavaju do trenutka kad se osuše.

7.1.7. Ostatak se spali zagrijavanjem do užarenosti na 600 °C u mufolnoj peći (5.9.) dok pepeo ne pobijeli, najmanje sat i pol vremena, ali se može ostaviti i preko noći.

7.1.8. Pokupi se pepeo s 10 ml 10 %-tne sumporne kiseline (4.5.) i prebaci s ispircima destilirane vode (4.1.) u odmjernu tikvicu od 50 ml (5.10.) te nadopuni do oznake destiliranom vodom na sobnoj temperaturi (4.1.). Alikvot od 5 ml ove otopine pepela koristi se za pripremu otopine uzorka za fotometrijsko određivanje fosfata.

7.2. **Fotometrijsko određivanje fosfata**

7.2.1. Poredbena otopina

7.2.1.1. Stavi se 10 ml 10 %-tne sumporne kiseline (4.5.) u odmjernu tikvicu od 50 ml (5.10.) i nadopuni do oznake destiliranom vodom (4.1.).

7.2.1.2. Alikvotu od 5 ml ove otopine (7.2.1.1.) u odmjernoj tikvici od 20 ml (5.11.) doda se 1 ml 1 N sumporne kiseline (4.6.) i 2 ml fosfatnog reagensa (4.8.) te dopuni do 20 ml destiliranom vodom (4.1.).

7.2.1.3. Začepi se labavo umetnutim čepom, promućka te grije u kipućoj vodenoj kupelji (5.7.) 10 minuta, a zatim hladi u vodenoj kupelji na 20 °C (5.4.) tijekom 20 minuta.

7.2.1.4. Kiveta od 1 cm (5.13.) napuni se ovom poredbenom otopinom.

7.2.2. Otopina uzorka

7.2.2.1. Alikvotu od 5 ml otopine pepela (7.1.8.), u odmjernoj tikvici od 20 ml (5.11.), doda se 1 ml 1 N sumporne kiseline (4.6.) i 2 ml fosfatnog reagensa (4.8.) te nadopuni do 20 ml destiliranom vodom (4.1.).

7.2.2.2. Začepi se labavo umetnutim čepom, promućka te grije u kipućoj vodenoj kupelji (5.7.) 10 minuta, a zatim hladi u vodenoj kupelji na 20 °C (5.4.) tijekom 20 minuta.

7.2.2.3. Žuta otopina koja je nastala odmah se analizira spektrofotometrijski (5.12.) u kiveti od 1 cm (5.13.) na 420 nm u odnosu na poredbenu otopinu (7.2.1.4.).

▼M1

7.2.3. Kalibracijska krivulja

7.2.3.1. Za dobivanje kalibracijske krivulje doda se 2 ml alikvota fosfatnog reagensa (4.8.) u odmjerne tikvice od 20 ml (5.11.), od kojih svaka sadrži 1 ml 1 N sumporne kiseline (4.6.) i 0, 2, 4, 6, 8 i 10 ml otopine kalijeva dihidrogenfosfata (4.7.) te dopuni do 20 ml destiliranom vodom (4.1.).

7.2.3.2. Začepi se labavo umetnutim čepom, promućka te grije u kipućoj vodenoj kupelji (5.7.) 10 minuta, a zatim hladi u vodenoj kupelji na 20 °C (5.4.) tijekom 20 minuta te analizira spektrofotometrijski (5.12). u kiveti od 1 cm (5.13.) na 420 nm u odnosu na poredbenu otopinu (7.2.1.4.).

7.2.3.3. Izrada kalibracijske krivulje:

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

8. **Izražavanje rezultata**

Sadržaj žumanjka u g/L izračuna se pomoću sljedeće formule:

$$\text{g/l egg yolk} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{density}}{E/40}$$

gdje je:

110. faktor konverzije za ukupni P_2O_5 u g u 100 g žumanjka

mg P_2O_5 vrijednost utvrđena kalibracijskom krivuljom

gustoća masa po jediničnom volumenu (g/ml) likera na bazi žumanjka na 20 °C

E masa likera na bazi žumanjka u g

40 faktor razrjeđenja za alikvot od 5 ml otopine pepela.

9. **Svojstva metode (preciznost)**

Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja:

sljedeća tablica daje vrijednosti za žumanjak.

Sljedeći su podaci dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina međulaboratorijskog ispitivanja:	1998.
Broj laboratorija:	24
Broj uzoraka:	5
Analit:	žumanjak

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija zadržan nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	19	20	22	20	22
Broj odstupanja (laboratorija)	3	4	2	4	2
Broj prihvaćenih rezultata	38	40	44	40	44
Srednja vrijednost	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Standardno odstupanje ponovljivosti (S_t) g/L	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Relativno standardno odstupanje ponovljivosti (RSD_t) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7

▼**M1**

Uzorci	A	B	C	D	E
Granica ponovljivosti (r) g/L	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Standardno odstupanje obnovljivosti (S_R) g/L	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Relativno standardno odstupanje obnovljivosti (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Granica obnovljivosti (R) g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Vrste uzoraka

A Advocaat, slijepe probe u duplikatu

B Advocaat, slijepe probe u duplikatu

C Advocaat, slijepe probe u duplikatu

D Advocaat (razrijeđen), razdijeljene razine (*)

E Advocaat, slijepe probe u duplikatu