Dokument ten służy wyłącznie do celów dokumentacyjnych i instytucje nie ponoszą żadnej odpowiedzialności za jego zawartość

►**B**

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 2870/2000

z dnia 19 grudnia 2000 r.

ustanawiające wspólnotowe metody referencyjne dla analizy napojów spirytusowych

(Dz.U. L 333 z 29.12.2000, str. 20)

zmienione przez:

		Dziennik Urzędowy		
		nr	strona	data
►**M1**	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2091/2002 z dnia 26 listopada 2002 r.	L 322	11	27.11.2002

▼B

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 2870/2000

z dnia 19 grudnia 2000 r.

ustanawiające wspólnotowe metody referencyjne dla analizy napojów spirytusowych

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając rozporządzenie Rady (EWG) nr 1576/89 z dnia 29 maja 1989 r. ustanawiające ogólne zasady definicji, opisu i prezentacji napojów spirytusowych ([1]), ostatnio zmienione Aktem Przystąpienia Austrii, Finlandii i Szwecji, w szczególności jego art. 4 ust. 8,

a także mając na uwadze, co następuje:

(1) Art. 4 ust. 8 rozporządzenia (EWG) nr 1576/89 przewiduje przyjęcie metod wykorzystywanych do analizy napojów spirytusowych. W przypadku przeprowadzania wszelkich urzędowych kontroli lub w przypadku sporu, dla zapewnienia zgodności z rozporządzeniem (EWG) nr 1576/89 oraz rozporządzeniem Komisji (EWG) nr 1014/90 z dnia 24 kwietnia 1990 r. ustanawiającym szczegółowe przepisy wykonawcze dla definicji, opisu i prezentacji napojów spirytusowych ([2]), ostatnio zmienionym rozporządzeniem (WE) nr 2140/98 ([3]), powinny być wykorzystywane metody referencyjne.

(2) Jak tylko jest to możliwe, użyteczne byłoby przyjęcie i opisanie metod ogólnie uznanych jako wspólnotowe analityczne metody referencyjne.

(3) W celu uwzględnienia postępu naukowego oraz różnic w wyposażeniu urzędowych laboratoriów, wykorzystanie metod opartych na zasadach pomiaru innych niż metody referencyjne opisane w Załączniku do niniejszego rozporządzenia może być dopuszczalne na odpowiedzialność dyrektora laboratorium, jeśli metody te dają wystarczającą gwarancję w odniesieniu do wyników, w szczególności spełniają kryteria ustanowione w Załączniku do dyrektywy Rady 85/591/EWG z dnia 20 grudnia 1985 r. dotyczącej wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy w celu monitorowania środków spożywczych przeznaczonych do spożycia przez ludzi ([4]) i może być wykazane, że odchylenia w dokładności, powtarzalności i odtwarzalności uzyskanych wyników są zgodne z ograniczeniami uzyskanymi zgodnie przy wykorzystaniu metod referencyjnych opisanych w niniejszym rozporządzeniu. Jeśli te warunki zostaną spełnione, dopuszczone będzie stosowanie innych metod analitycznych. Jednakże istotnym jest, by podkreślić, że w sytuacjach spornych inne metody nie mogą zastąpić metod referencyjnych.

(4) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniem są zgodne z opinią Komitetu Wdrażającego ds. Napojów Spirytusowych,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

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

▼B

Artykuł 1

W celu zapewnienia zgodności z rozporządzeniem (EWG) nr 1576/89 i rozporządzeniem (EWG) nr 1014/90, wspólnotowe metody referencyjne dla analizy napojów spirytusowych, stosowane:

— w przypadku przeprowadzania urzędowej kontroli, lub

— w przypadku sporu,

są takie jak określono w Załączniku do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Nie naruszając art. 1 tiret pierwsze, na odpowiedzialność dyrektora laboratorium, dozwolone są inne metody analityczne, pod warunkiem, że ich dokładność i precyzja (powtarzalność i odtwarzalność) są przynajmniej równoważne odpowiadającym im analitycznym metodom referencyjnym określonym w Załączniku.

Artykuł 3

Jeśli wspólnotowe analityczne metody referencyjne nie zostały ustanowione dla wykrywania i kwantyfikacji substancji zawartych w niektórych napojach spirytusowych, mogą zostać wykorzystane następujące metody:

a) metody analityczne, które są potwierdzone dla procedur uznanych międzynarodowo, w szczególności spełniają kryteria określone w Załączniku do dyrektywy 85/591/EWG;

b) metody analityczne odpowiadające zalecanym normom Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej (ISO);

c) metody analityczne, które są uznane przez Ogólne Zgromadzenie Międzynarodowego Biura ds. Wina i Winorośli (OIV) i są opublikowane przez to Biuro;

d) w przypadku braku metod wskazanych w lit. a), b) lub c) ze względu na dokładność, powtarzalność i odtwarzalność wyników:

   — metody analityczne zatwierdzone przez dane Państwo Członkowskie,

   — o ile jest to konieczne, inne odpowiednie metody analityczne.

Artykuł 4

Dla celów niniejszego rozporządzenia:

a) „granicę powtarzalności” należy rozumieć jako wartość, której z prawdopodobieństwem 95 % nie przekracza wartość bezwzględna różnicy między dwoma wynikami badania otrzymanymi w spełnionych warunkach powtarzalności (ten sam operator, ta sama aparatura, to samo laboratorium i krótki odstęp czasu) {ISO 3534-1};

b) „granicę odtwarzalności” należy rozumieć jako wartość, której z prawdopodobieństwem 95 % nie przekracza wartość bezwzględna różnicy między dwoma wynikami badania otrzymanymi w spełnionych warunkach odtwarzalności (różni operatorzy, różna aparatura, różne laboratoria) {ISO 3534-1};

c) „dokładność” należy rozumieć jako stopień zgodności między wynikiem badania i przyjętą wartością odniesienia {ISO 3534-1}.

▼B

Artykuł 5

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie siódmego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia 1 stycznia 2001 r.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich Państwach Członkowskich.

▼B

ZAŁĄCZNIK

OPIS ANALITYCZNYCH METOD REFERENCYJNYCH

I. Oznaczanie zawartości alkoholu objętościowo

Dodatek I: Przygotowanie destylatu

Dodatek II: Pomiar gęstości destylatu

— Metoda A = piknometria

— Metoda B = elektroniczny pomiar gęstości

— Metoda C = pomiar gęstości przy wykorzystaniu wagi hydrostatycznej

II. Oznaczanie ogólnego suchego ekstraktu przy wykorzystaniu analizy grawimetrycznej

III. Oznaczanie substancji lotnych i metanolu

III.1 Ogólne uwagi

III.2 Lotne związki pokrewne: aldehydy, wyższe alkohole, octan etylu oraz metanol (chromatografia gazowa)

III.3 Kwasowość lotna (p.m.)

IV. Kwas cyjanowodorowy (p.m.)

V. Anetol ►M1 ——————— ◄

VI. Kwas lukrecjowy ►M1 ——————— ◄

VII. Chalkon ►M1 ——————— ◄

VIII. Cukry łącznie (p.m.)

IX. Żółtko jaja ►M1 ——————— ◄

▼B

I. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ALKOHOLU OBJĘTOŚCIOWO W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH

Wprowadzenie

Metoda referencyjna obejmuje dwa dodatki:

Dodatek I: Przygotowanie destylatu

Dodatek II: Pomiar gęstości destylatu

1. **Zakres**

Metoda ta jest właściwa dla oznaczania rzeczywistej zawartości alkoholu objętościowo w napojach spirytusowych.

2. **Odniesienia normatywne**

ISO 3696:1987: Woda wykorzystywana w laboratorium analitycznym – specyfikacja oraz metody do badań.

3. **Terminy i definicje**

3.1. *Temperatura referencyjna:*

Temperatura odniesienia oznaczania zawartości alkoholu objętościowo, gęstości i ciężaru właściwego napojów spirytusowych wynosi 20 °C.

Uwaga 1: Określenie „w temperaturze t °C" jest zarezerwowane dla wszystkich oznaczeń (gęstości lub zawartości alkoholu objętościowo) w temperaturze innej niż temperatura odniesienia 20 °C.

3.2. *Gęstość:*

Gęstość jest to masa do jednostki objętości napoju spirytusowego w próżni w temperaturze 20 °C. Jest wyrażana w kilogramach na metr sześcienny i jej symbol to ρ20 °C lub ρ20.

3.3. *Ciężar właściwy:*

Ciężar właściwy jest to stosunek, wyrażony jako liczba dziesiętna, gęstości napojów spirytusowych w temperaturze 20 °C do gęstości wody w takiej samej temperaturze. Jest oznaczany symbolem d20 ° C/20 °C lub d20/20' lub wprost przez d, gdy nie ma możliwości wystąpienia pomyłki. Zmierzona charakterystyka musi zostać podana na certyfikacie oznaczenia wyłącznie przy wykorzystaniu symboli powyżej zdefiniowanych.

Uwaga 2: Jest możliwe obliczenie ciężaru właściwego z gęstości ρ20 w temperaturze 20 °C:

$\rho 20 = 998{,}203 \times d20/20$ lub $d20/20 = \rho 20/998{,}203$

gdzie 998,203 oznacza gęstość wody w temperaturze 20 °C.

3.4. *Rzeczywista zawartość alkoholu objętościowo:*

Rzeczywista zawartość alkoholu objętościowo w napojach spirytusowych jest równa ilości litrów alkoholu etylowego zawartych w 100 l mieszaniny woda – alkohol o takiej samej gęstości jak alkohol lub wyrób alkoholowy po destylacji. Wartości odniesienia dla zawartości alkoholu objętościowo (% obj.) w temperaturze 20 °C w stosunku do gęstości w temperaturze 20 °C dla różnych mieszanin woda – alkohol, które można wykorzystać, są podane w międzynarodowych tabelach przyjętych przez Międzynarodową Organizację Metrologii Prawnej w jej zaleceniu nr 22.

Ogólne równanie dotyczące zawartość alkoholu objętościowo oraz gęstości mieszaniny woda – alkohol w określonej temperaturze jest podane na stronie 40 w rozdziale 3 „Zawartość alkoholu objętościowo" w Załączniku do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 2676/90 (Dz.U. L 272 z 3.10.1990, str. 1) lub w podręczniku do metod analitycznych OIV (1994) (str. 17).

Uwaga 3: Dla likierów i kremów w przypadku, których bardzo trudno jest dokładnie zmierzyć objętość, próbka musi być zważona i obliczona zawartość alkoholu wagowo.

▼B

Wzór na przekształcenie:

$$\text{zawartość w alkoholu objętościowo (\% obj.)} = \frac{\text{ASM (\% wagowo)} \times P_{20}\,\text{(próbka)}}{P_{20}\,\text{(alkohol)}}$$

gdzie

ASM = zawartość alkoholu wagowo

P20 (alkohol) = 789,24 kg/m^3

4. **Zasada**

Po destylacji, zawartość alkoholu objętościowo w destylacie określana jest piknometrycznie, przy pomocy elektronicznego pomiaru gęstości lub pomiaru gęstości przy wykorzystaniu wagi hydrostatycznej.

▼B

DODATEK I: PRZYGOTOWANIE DESTYLATU

1. **Zakres**

Metoda jest właściwa do przygotowania destylatów wykorzystywanych do oznaczania rzeczywistej zawartości objętościowo w napojach spirytusowych.

2. **Zasada**

Wyroby spirytusowe są destylowane w celu oddzielenia alkoholu etylowego i innych związków lotnych z materii ekstrakcyjnej (związki, które nie destylują).

3. **Odczynniki i materiały**

3.1. Granulki przeciwwstrząsowe.

3.2. Stężona zawiesina przeciwpieniąca (do likierów kremowych).

4. **Aparatura i wyposażenie**

Zwykła aparatura laboratoryjna i w szczególności następujące.

4.1. Łaźnia wodna zdolna do utrzymywania temperatury 10 °C–15 °C.

Łaźnia wodna zdolna do utrzymywania temperatury 20 °C (± 0,2 °C).

4.2. Kolby pomiarowe klasy A, 100 ml oraz 200 ml, które zostały certyfikowane, odpowiednio, do 0,1 % oraz 0,15 %.

4.3. Aparatura destylacyjna:

4.3.1. Ogólne wymogi

Aparatura destylacyjna musi być zgodna z poniższą specyfikacją:

— ilość połączeń nie może być większa niż niezbędne potrzebne minimum w celu zapewnienia, że system jest szczelny,

— dołączone jest urządzenie przeznaczone do unikania plucia (porywania wrzącej cieczy przez parę) oraz regulacji szybkości destylacji par bogatych w alkohol,

— szybka i całkowita kondensacja par alkoholowych,

— zbieranie pierwszych frakcji destylacyjnych w środowisku wodnym.

Źródło ciepła musi być wykorzystywane wraz rozpraszaczem ciepła w celu uniknięcia reakcji samozapłonu materii ekstrakcyjnej.

4.3.2. Przykład właściwej aparatury destylacyjnej podany jest na rysunku 1 i obejmuje następujące części:

— kolba okrągłodenna o pojemności 1 litra ze znormalizowanym złączem szlifowym,

— kolumna rektyfikacyjna o wysokości minimum 20 cm (np.: kolumna Vigreux),

— łącznik rurowy z 10 cm długości z prostoobręczowym kondensatorem (kondensator typu West) umocowany poziomo,

— spirala chłodząca, długości 40 cm,

— wyciągnięta w górę rurka pobierająca destylat z dna skalowanej kolby zbierającej zawierającej niewielką ilość wody.

Uwaga: Aparatura opisana powyżej przeznaczona jest do próbek nie mniejszych niż 200 ml. Jednakże mniejsze próbki (100 ml) mogą być destylowane przy wykorzystaniu mniejszych kolb destylacyjnych, pod warunkiem użycia łapacza kropli lub innego podobnego urządzenia w celu uniknięcia porywania kropelek cieczy.

5. **Przechowywanie próbek do badań**

Próbki powinny być przechowywane przed analizą w temperaturze pokojowej.

▼B

6. **Procedura**

Uwaga wstępna:

Destylacja może zostać przeprowadzona według procedury opublikowanej przez IUPAC (1968).

6.1. Sprawdzenie aparatury destylacyjnej.

Wykorzystywana aparatura musi być zdolna do następujących:

Destylacja 200 ml roztworu woda – alkohol o znanym stężeniu, zbliżonym do 50 % obj., nie może spowodować straty alkoholu większej niż 0,1 % obj.

6.2. Napoje spirytusowe o zawartości alkoholu poniżej 50 % obj.

Odmierzyć 200 ml alkoholi do kolby pomiarowej.

Zanotować temperaturę tej cieczy i utrzymywać w temperaturze standardowej (20 °C).

Wlać próbkę do okrągłodennej kolby w aparaturze destylacyjnej i przepłukać kolbę miarową trzykrotnie, wykorzystując każdorazowo około 20 ml wody destylowanej. Dodać każdorazowo wodę z płukania do zawartości kolby destylacyjnej.

Uwaga: To 60 ml rozcieńczenie jest wystarczające dla alkoholi zawierających mniej niż 250 g suchego ekstraktu na litr. W innym wypadku w celu uniknięcia pyrolizy, objętość rozcieńczającej wody musi wynosić przynajmniej 70 ml, jeśli stężenie suchego ekstraktu wynosi 300 g/l, 85 ml dla 400 g/l suchego ekstraktu oraz 100 ml dla 500 g/l suchego ekstraktu (niektóre likiery owocowe lub kremy). Dostosować te objętości proporcjonalnie do różnych objętości próbek.

Dodać kilka granulek przeciwwstrząsowych (ppkt 3.1) (oraz środek do likierów kremowych przeciwdziałający pienieniu).

Wlać 20 ml wody destylowanej do oryginalnej 200 ml kolby pomiarowej, która zostanie wykorzystana do przechowywania destylatu. Kolba ta musi zostać umieszczona następnie w łaźni z zimną wodą (ppkt 4.1) (10–15 °C dla napojów spirytusowych z dodatkiem anyżku).

Prowadzić destylację, unikając porywania cieczy lub zwęglania, wstrząsając od czasu do czasu zawartością kolby, do momentu, gdy destylat osiągnie poziom kilka milimetrów poniżej kreski na kolbie pomiarowej.

Gdy temperatura destylatu zostanie obniżona w granicy 0,5 °C początkowej temperatury cieczy, dopełnić do kreski wodą destylowaną i starannie wymieszać.

Destylat ten jest wykorzystywany do oznaczania zawartości alkoholu objętościowo (dodatek II).

6.3. Napoje spirytusowe o zawartości alkoholu powyżej 50 % obj.

Odmierzyć 100 ml napoju spirytusowego do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml i następnie wlać do kolby okrągłodennej w aparacie destylacyjnym.

Przepłukać kolbę pomiarową kilkakrotnie wodą destylowaną i wlać wodę z płukania do zawartości kolby okrągłodennej. Użyć wystarczającej ilości wody, by doprowadzić zawartość kolby do około 230 ml.

Wlać 20 ml destylowanej wody do kolby pomiarowej o pojemności 200 ml, która zostanie wykorzystana do przechowywania destylatu. Kolba ta musi zostać umieszczona następnie w łaźni z zimną wodą (ppkt 4.1) (10–15 °C dla napojów spirytusowych z dodatkiem anyżku).

Destylować, wstrząsając okresowo do momentu, gdy poziom destylatu osiągnie poziom kilka milimetrów poniżej kreski kalibracyjnej kolby pomiarowej o pojemności 200 ml.

Gdy temperatura destylatu zostanie obniżona w granice 0,5 °C początkowej temperatury cieczy, dopełnić do kreski destylowaną wodą i gruntownie wymieszać.

▼B

Destylat ten jest wykorzystywany do oznaczania zawartości alkoholu objętościowo (dodatek II).

Uwaga: Zawartość alkoholu objętościowo w napoju spirytusowym jest podwojoną zawartością alkoholu w destylacie.

▼B

DODATEK II: POMIAR GĘSTOŚCI DESTYLATU

METODA A: OZNACZANIE RZECZYWISTEJ ZAWARTOŚCI ALKOHOLU OBJĘTOŚCIOWO W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH – POMIAR PIKNOMETRYCZNY

A.1. **Zasada**

Zawartość alkoholu objętościowo jest uzyskiwana na podstawie gęstości destylatu mierzonej piknometrycznie.

A.2. **Odczynniki i materiały**

W trakcie analizy, o ile nie jest to inaczej określone, korzystać wyłącznie z odczynników o rozpoznanym stopniu analitycznym oraz wody o przynajmniej 3 stopniu czystości, zgodnie z definicją ISO 3696:1987.

A.2.1. Roztwór chlorku sodu (2 % wag./obj.)

W celu przygotowania 1 litra, zważyć 20 g chlorku sodu i rozpuścić w wodzie do otrzymania 1 litra.

A.3. **Aparatura i wyposażenie**

Zwykła aparatura laboratoryjna i w szczególności następujące:

A.3.1. Waga analityczna zdolna do odczytu 0,1 mg.

A.3.2. Termometr ze złączem szlifowym, wyskalowany do dziesiętnych części stopnia w zakresie 10 °C–30 °C. Termometr ten musi być certyfikowany lub sprawdzony z certyfikowanym termometrem.

A.3.3. Piknometr ze szkła pyreksowego o pojemności około 100 ml z usuwalnym termometrem ze szlifem (ppkt. A.3.2). Piknometr jest zaopatrzony w boczną rurkę o długości 25 mm i średnicy wewnętrznej maksymalnie 1 mm, zakończoną stożkowym złączem szlifowanym. Inne piknometry, opisane w ISO 3507, np. 50 ml, mogą, o ile jest to właściwe, być wykorzystane.

A.3.4. Butlę do tarowania o takiej samej objętości zewnętrznej (w granicach 1 ml) jak piknometr oraz o masie równej masie piknometru wypełnionego cieczą o gęstości 1,01 (roztwór chlorku sodu A.2.1).

A.3.5. Osłona izolująca termicznie, która pasuje dokładnie do obudowy piknometru.

Uwaga 1: Metoda oznaczania gęstości w próżni wyrobów spirytusowych wymaga wykorzystania wagi dwuszalkowej, piknometru oraz starowanej butli o takiej samej zewnętrznej objętości w celu usunięcia w danym momencie wpływu wyporu powietrza. Ta prosta technika może być stosowana przy wykorzystaniu wagi jednoszalkowej, zakładając, że tara butli jest ponownie ważona w celu monitorowania zmian w wyporze powietrza w czasie.

A.4. **Procedura**

Uwagi wstępne:

Procedura przedstawiona poniżej stosowana jest do wykorzystania z piknometrem o pojemności 100 ml do oznaczania zawartości alkoholu, co daje najlepszą dokładność. Jednakże możliwe jest również wykorzystanie mniejszych piknometrów, np. 50 ml.

A.4.1. Kalibracja piknometru

Kalibracji piknometru dokonuje się poprzez określenie następujących parametrów:

— tary pustego piknometru,

— pojemności piknometru w temperaturze 20 °C,

— masy piknometru wypełnionego wodą w temperaturze 20 °C.

A.4.1.1. Kalibracja z wykorzystaniem wagi jednoszalkowej:

Określić:

— masę czystego, suchego piknometru (P),

▼B

— masę piknometru wypełnionego wodą w temperaturze t °C (P1),

— masę butli do tarowania (T0).

A.4.1.1.1. Zważyć czysty, suchy piknometr (P).

A.4.1.1.2. Wypełnić ostrożnie piknometr wodą destylowaną o temperaturze otoczenia i zamocować termometr.

Ostrożnie wytrzeć piknometr do sucha i umieścić go w osłonie izolującej termicznie. Mieszać poprzez przekręcanie pojemnika do momentu, gdy odczyty temperatury na termometrze staną się stałe.

Ustawić wylew z piknometru z górnej obręczy bocznej rurki. Odczytać ostrożnie temperaturę t °C i jeśli jest to konieczne, poprawić wszelkie nieprawidłowości na skali temperatury.

Zważyć piknometr wypełniony wodą (P1).

A.4.1.1.3. Zważyć butlę do tarowania (TO).

A.4.1.1.4. Obliczenia

— Tara pustego piknometru = P – m

gdzie m jest masą powietrza w piknometrze.

m = 0,0012 x (P1 – P)

Uwaga 2: 0,0012 jest gęstością suchego powietrza w temperaturze 20 °C i pod ciśnieniem 760 mm Hg

— Pojemność piknometru w temperaturze 20 °C:

$$V_{20\,^{\circ}C} = [P1 - (P - m)] \times F_{t'}1$$

gdzie Ft jest współczynnikiem dla temperatury t °C wziętym z rozdziału 1 tabela I „Gęstość i ciężar właściwy” w Załączniku do rozporządzenia (EWG) 2676/90 (str. 10).

V20 °C musi być znane z dokładnością do 0,001 ml.

— Masa wody w piknometrze w temperaturze 20 °C:

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

gdzie 0,998203 jest gęstością wody w temperaturze 20 °C.

Uwaga 3: Jeśli jest to konieczne, można użyć wartości 0,99715 jako gęstości powietrza i zawartość alkoholu obliczyć w odniesieniu do odpowiadającej gęstości w tabelach HM Customs and Excise Zjednoczonego Królestwa dotyczących powietrza.

A.4.1.2. Metoda kalibracji przy wykorzystaniu wagi dwuszalkowej:

A.4.1.2.1. Umieścić butlę do tarowania na szalce z lewej strony i czysty, suchy piknometr wraz z jego zamknięciem zbierającym na szalce z prawej strony: Zrównoważyć poprzez układanie odważników po stronie piknometru: p gramów.

A.4.1.2.2. Ostrożnie wypełnić piknometr destylowaną wodą o temperaturze otoczenia i zamontować termometr; ostrożnie wytrzeć piknometr do sucha i umieścić go w osłonie izolującej termicznie. Mieszać poprzez przekręcanie pojemnika do momentu, gdy odczyty temperatury na termometrze ustabilizują się.

Dokładnie ustawić poziom górnej obręczy bocznej rurki. Wytrzeć boczną rurkę, dopasować zamknięcie zbierające, odczytaj ostrożnie temperaturę t °C i jeśli jest to konieczne poprawić wszelkie nieprawidłowości na skali temperatury.

Zważyć piknometr wypełniony wodą, z wagą p w gramach stanowiącą równowagę.

A.4.1.2.3. Obliczenia

▼B

— Wytarować pusty piknometr = p + m

gdzie m jest masą powietrza w piknometrze

m = 0,0012 x (p - p)

— Pojemność pikometru w temperaturze 20 °C:

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

gdzie Ft jest współczynnikiem dla temperatury t °C wziętym z rozdziału 1 tabela I „Gęstość i ciężar właściwy" w Załączniku do rozporządzenia (EWG) 2676/90 (str. 10).

V20 °C musi być znane z dokładnością do 0,001 ml.

— Masa wody w piknometrze w temperaturze 20 °C:

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

gdzie 0,998203 jest gęstością wody w temperaturze 20 °C.

A.4.2. Oznaczanie zawartości alkoholu w próbce do badań

A.4.2.1. Wykorzystując wagę jednoszalkową.

A.4.2.1.1. Zważyć butlę do tarowania, waga T1.

A.4.2.1.2. Zważyć piknometr z przygotowanym destylatem (patrz dodatek I), P2 jest jego wagą w t °C.

A.4.2.1.3. Obliczenia

— dT = T1 – T0

— Masa pustego piknometru w momencie pomiaru

= P – m + dT

— Masa cieczy w piknometrze w temperaturze t °C

= P2 – (P – m + dT)

— Gęstość w temperaturze t °C w g/ml

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

— Wyrazić gęstość w t °C w kilogramach na m^3 poprzez przemnożenie ρt °C przez 1 000, wartość znaną jako ρt.

Poprawić ρt, do 20 wykorzystując tabelę gęstości ρT dla mieszanin woda – alkohol (tabela II dodatek II do podręcznika OIV do metod analitycznych (1994), str. 17–29).

W tabeli znaleźć poziomą linię odpowiadającą temperaturze T w pełnych stopniach bezpośrednio poniżej temperatury t °C, najmniejszą gęstość nad gęstością ρt. Wykorzystać różnicę z tabeli, określoną poniżej tej gęstości do obliczenia gęstości ρt, alkoholu w temperaturze T w całych stopniach.

— Wykorzystując pełną linię temperatury, obliczyć różnicę między gęstością p w tabeli bezpośrednio poniżej ρt a obliczoną gęstością ρt. Podzielić różnice przez różnicę z tabeli, którą można znaleźć na prawo od gęstości ρ. Iloraz przewiduje dziesiętną część zawartości alkoholu, podczas gdy liczba całkowita zawartości alkoholu znajduje się na szczycie kolumny z gęstością ρ (Dt, zawartość alkoholu).

Uwaga 4: Alternatywnie utrzymywać piknometr w łaźni wodnej utrzymywanej w temperaturze 20 °C (± 0,2 °C) podczas uzupełniania do kreski.

A.4.2.1.4. Wyniki

Wykorzystując gęstość ρ20 obliczyć rzeczywistą zawartość alkoholu przy użyciu tabel zawartości alkoholu określonych poniżej:

Tabele podające wartość zawartości alkoholu objętościowo (% obj.) w temperaturze 20 °C jako funkcję gęstości w mieszaninie woda – alkohol o temperaturze 20 °C jest tabelą międzynarodową przyjętą przez Międzynarodową Organizację Metrologii Prawnej w jej zaleceniu nr 22.

A.4.2.2. Metoda wykorzystująca wagę jednoszalkową

▼B

A.4.2.2.1. Zważyć piknometr z przygotowanym destylatem (patrz część I), p jest masą w temperaturze t °C.

A.4.2.2.2. Obliczenia

— Masa cieczy w piknometrze w temperaturze t °C

= p + m – p

— Gęstość w temperaturze t °C w g/ml

$P_{t°C} = (p + m - p'')/V_{20°C}$

— Wyrazić gęstość w t °C w kilogramach na m^3 i przeprowadzić poprawkę na temperaturę w celu obliczenia zawartości alkoholu w temperaturze 20 °C, tak jak wyżej wskazano dla wagi jednoszalkowej.

A.5. **Charakterystyka wydajnościowa metody (precyzja)**

A.5.1. Statystyczne wyniki badań międzylaboratoryjnych

Poniższe dane zostały uzyskane ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami [1] [2].

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	20
Ilość próbek	6

Próbki	A	B	C	D	E	F
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	19	20	17	19	19	17
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	1	-	2	1	1	3
Ilość akceptowanych wyników	38	40	34	38	38	34
Wartość średnia($\bar{x}$)()% obj.	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51*			42,93*	45,73*	63,03*
Standard powtarzalności (Sr)% obj.	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDt) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Granica powtarzalności (r) w% obj.	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR)% obj.	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Granica odtwarzalności (R) w % obj.	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Rodzaje próbek
A Likier owocowy; poziom rozdzielony*.
B Brand; ślepe duplikaty.
C Whisky; ślepe duplikaty.
D Grappa; poziom rozdzielony*.
E Aquavit; poziom rozdzielony*.
F Rum; poziom rozdzielony*.

▼B

METODA B: OZNACZANIE RZECZYWISTEJ ZAWARTOŚCI ALKOHOLU OBJĘTOŚCIOWO W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH – ELEKTRONICZNY POMIAR GĘSTOŚCI (OPARTY NA REZONANSOWEJ OSCYLACJI CZĘSTOTLIWOŚĆ PRÓBKI W CELCE OSCYLALATORA)

B.1. **Zasada**

Gęstość cieczy jest określana przez pomiar elektronicznych oscylacji w wibrującej rurze U. W celu przeprowadzenia tego pomiaru, próbka jest dodawana do systemu oscylacyjnego, którego specjalna częstotliwość oscylowania jest jednocześnie modyfikowana przez dodaną masę.

B.2. **Odczynniki i materiały**

W trakcie analizy, o ile nie jest to inaczej określone, korzystaj wyłącznie z odczynników o rozpoznanym stopniu analitycznym oraz wody o przynajmniej 3 stopniu, zgodnie z definicją ISO 3696:1987.

B.2.1. Aceton (CAS 686-52-4) lub alkohol bezwodny.

B.2.2. Suche powietrze.

B.3. **Aparatura i wyposażenie**

Zwyczajna aparatura laboratoryjna w tym w szczególności:

B.3.1. Cyfrowy wyświetlacz gęstościomierza

Elektroniczny gęstościomierz przeprowadzający takie pomiary musi być zdolny do wyrażenia gęstości w g/ml do 5 dziesiętnych miejsc.

Uwaga 1: Gęstościomierz powinien być umieszczony na doskonale stabilnym umocowaniu, które jest izolowane od wibracji.

B.3.2. Regulacja temperatury

Wyniki gęstościomierza są ważne wyłącznie wtedy, gdy celka pomiarowa jest połączona z regulatorem temperatury, który jest w stanie osiągnąć stabilną temperaturę o poziomie odchyleń ± 0,02 °C lub mniej.

Uwaga 2: Precyzyjne ustawienie oraz monitorowanie temperatury w celce pomiarowej jest bardzo ważne, gdyż błąd na poziomie 0,1 °C może prowadzić do odchylenia w gęstości na poziomie 0,1 kg/m^3.

B.3.3. Zwykłe strzykawki lekarskie lub próbnik automatyczny.

B.4. **Procedura**

B.4.1. Kalibracja gęstościomierza

Aparaturę należy wykalibrować zgodnie z instrukcją producenta urządzenia, kiedy jest po raz pierwszy uruchomione. Musi być regularnie kalibrowana ponownie i sprawdzana w stosunku do certyfikowanych wzorców referencyjnych lub wewnątrz laboratoryjnych rozwiązaniach referencyjnych opartych na certyfikowanych standardach referencyjnych.

B.4.2. Oznaczanie gęstości próbki

B.4.2.1. Jeśli jest to wymagane, przed pomiarem oczyść i osuszyć celkę acetonem lub alkoholem bezwodnym oraz suchym powietrzem. Przemyć celkę próbką.

B.4.2.2. Wstrzyknąć próbę do celki (używając strzykawki lub próbnika automatycznego) tak by celka całkowicie się wypełniła. W trakcie czynności zapełniania upewnić się, czy wyeliminowane zostały wszelkie pęcherzyki powietrza. Próbka musi być jednorodna i nie może zawierać żadnych stałych elementów. Wszelką zawiesinę należy odsączyć przed analizą.

B.4.2.3. Gdy odczyty się ustabilizują, zanotować gęstość $\rho 20$ lub zawartość alkoholu wskazaną na gęstościomierzu.

B.4.3. Wyniki

▼B

Gdy wykorzystywana jest gęstość ρ20, obliczyć rzeczywistą zawartość alkoholu, wykorzystując tabele zawartości alkoholu określone poniżej.

Tabele podające zawartość alkoholu objętościowo (% obj.) w temperaturze 20 °C jako funkcję gęstości w mieszaninie woda – alkohol o temperaturze 20 °C są to tabele międzynarodowe przyjęte przez Międzynarodową Organizację Metrologii Prawnej w jej zaleceniu nr 22.

B.5. **Charakterystyka wydajnościowa metody (precyzja)**

B.5.1. Statystyczne wyniki testów międzylaboratoryjnych

Poniższe dane zostały uzyskane ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami [1] [2].

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	16
Ilość próbek	6

Próbki	A	B	C	D	E	F
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	11	13	15	16	14	13
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	2	3	1	-	1	2
Ilość akceptowanych wyników	22	26	30	32	28	26
Wartość średnia($\bar{x}$)()% obj.	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52*			43,10*	45,91*	63,31*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr)% obj.	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Granica powtarzalności (r) w% obj.	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR)% obj.	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Granica odtwarzalności (R) w % obj.	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Rodzaje próbek
A Likier owocowy; poziom rozdzielony*.
B Brandy; ślepe duplikaty.
C Whisky; ślepe duplikaty.
D Grappa; poziom rozdzielony*.
E Aquavit; poziom rozdzielony*.
F Rum; poziom rozdzielony*.

METODA C: OZNACZANIE RZECZYWISTEJ ZAWARTOŚCI ALKOHOLU OBJĘTOŚCIOWO W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH – POMIAR GĘSTOŚCI PRZY WYKORZYSTANIU WAGI HYDROSTATYCZNEJ

C.1. **Zasada**

Zawartość alkoholu w wyrobach spirytusowych może być mierzona densometrycznie przy użyciu wagi hydrostatycznej opartej na prawie Archimedesa, zgodnie z którym na ciało zanurzone w cieczy działa pionowy ciąg do góry cieczy równej ciężarowi cieczy wypartej.

C.2. **Odczynniki i materiały**

W trakcie analizy, o ile nie jest to inaczej określone, korzystać wyłącznie odczynników o rozpoznanym stopniu analitycznym oraz wody o przynajmniej 3 stopniu czystości, zgodnie z definicją ISO 3696:1987.

▼B

C.2.1. Roztwór do czyszczenia pływaka (wodorotlenek sodu, 30 % wag./obj.)

W celu przygotowania 100 ml, odważyć 30 g wodorotlenku sodu i dopełnić do objętości, wykorzystując etanol o zawartości 96 % obj.

C.3. **Aparatura i wyposażenie**

Zwyczajna aparatura laboratoryjna w szczególności następujące:

C.3.1. Jednoszalkowa waga hydrostatyczna o czułości 1 mg.

C.3.2. Pływak o objętości przynajmniej 20 ml, specjalnie przystosowany do wagi, podwieszony przy pomocy nitki o średnicy nieprzekraczającej 0,1 mm.

C.3.3. Cylinder pomiarowy z jedną kreską Pływak musi być zdolny do utrzymywania się całkowicie w objętości cylindra poniżej kreski; powierzchnia cieczy może być penetrowana wyłącznie przez wspierającą nitkę. Cylinder pomiarowy musi mieć wewnętrzną średnicę większą przynajmniej o 6 mm niż średnica pływaka.

C.3.4. Termometr (lub próbnik mierzący temperaturę) wyskalowany w stopniach i dziesiętnych stopnia od 10 °C do 40 °C, kalibrowany z dokładnością do 0,05 °C.

C.3.5. Odważniki kalibrowane przez uznaną jednostkę certyfikującą.

Uwaga 1: Wykorzystanie wagi dwuszalkowej jest również możliwe; zasada opisana jest w rozdziale 1 „Gęstość i ciężar właściwy” w Załączniku do rozporządzenia (EWG) nr 2676/90 (str. 7).

C.4. **Procedura**

Pływak oraz cylinder pomiarowy należy oczyścić wodą destylowaną między pomiarami, osuszyć przy pomocy miękkiej bibuły laboratoryjnej, który nie pozostawia włókien i przemyć roztworem, którego gęstość będzie oznaczana. Pomiary muszą być przeprowadzone jak tylko aparatura osiągnie stabilność w celu ograniczenia strat alkoholu w wyniku odparowania.

C.4.1. Kalibracja wagi

Chociaż wagi posiadają zwykle wewnętrzny system kalibracji, waga hydrostatyczna musi mieć zdolność do kalibracji z obciążnikami sprawdzonymi przez oficjalną jednostkę certyfikującą.

C.4.2. Kalibracja pływaka

C.4.2.1. Napełnić cylinder pomiarowy do kreski podwójnie destylowaną wodą (lub wodą o równoważnej czystości, np.: wodą mikrofiltrowaną o konduktywności 18,2 MΩ/cm) o temperaturze między 15 °C a 25 °C, ale najlepiej 20 °C.

C.4.2.2. Zanurzyć pływak i termometr, wymieszać, odczytać gęstość cieczy na urządzeniu oraz, jeśli jest to konieczne, poprawić odczyt tak, by był równy temperaturze wody w temperaturze pomiaru.

C.4.3. Kontrola przy wykorzystaniu roztworu woda – alkohol

C.4.3.1. Wypełnić cylinder pomiarowy do kreski, mieszaniną woda – alkohol o znanej zawartości w temperaturze między 15 °C a 25 °C, ale najlepiej w wysokości 20 °C.

C.4.3.2. Zanurzyć pływak i termometr, wymieszać, odczytać gęstość cieczy (lub zawartość alkoholu, jeśli jest to możliwe) na urządzeniu. Zaleca się, aby tak ustalona zawartość alkoholu była równa poprzednio określonej zawartości alkoholu.

Uwaga 2. Roztwór ten o znanej zawartości alkoholu może być również używany do kalibrowania pływaka zamiast wody podwójnie destylowanej.

C.4.4. Pomiar gęstości destylatu (lub jego zawartość alkoholu, jeśli urządzenie zezwala)

C.4.4.1. Wlać próbkę do cylindra pomiarowego do kreski.

▼B

C.4.4.2. Zanurzyć pływak i termometr, wymieszać, odczytać gęstość cieczy (lub zawartość alkoholu, jeśli jest to możliwe) z urządzenia. Zanotować temperaturę, jeśli zmierzono gęstość w t °C (ρt).

C.4.4.3. Poprawić ρt do 20, wykorzystując tabelę gęstości ρT dla mieszanin woda – alkohol (tabela II załącznik II podręcznika do metod analitycznych OIV (1994) (str. 17–29).

C.4.5. Czyszczenie pływaka i cylindra pomiarowego

C.4.5.1. Zanurzyć pływak w roztworze do czyszczenia pływaka w cylindrze pomiarowym.

C.4.5.2. Moczyć przez godzinę, od czasu do czasu obracając pływak.

C.4.5.3. Wypłukać dużą ilością wody bieżącej, a następnie wodą destylowaną.

C.4.5.4. Osuszyć miękką bibułą laboratoryjną, która nie pozostawia włókien.

Przeprowadzić tę procedurę, kiedy pływak jest używany po raz pierwszy, a po tym, jeśli jest to wymagane regularnie.

C.4.6. Wyniki

Wykorzystując gęstość ρ20, obliczyć rzeczywistą zawartość alkoholu, wykorzystując tabele zawartości alkoholu określone poniżej.

Tabele, podające zawartość alkoholu objętościowo (% obj.) w temperaturze 20 °C jako funkcję gęstości w mieszaninie woda – alkohol o temperaturze 20 °C, są tabelami międzynarodowymi przyjętymi przez Międzynarodową Organizację Metrologii Prawnej w jej zaleceniu nr 22.

C.5. **Charakterystyka wydajnościowa metody (precyzja)**

C.5.1. Statystyczne wyniki testów międzylaboratoryjnych

Poniższe dane zostały uzyskane ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami [1] [2].

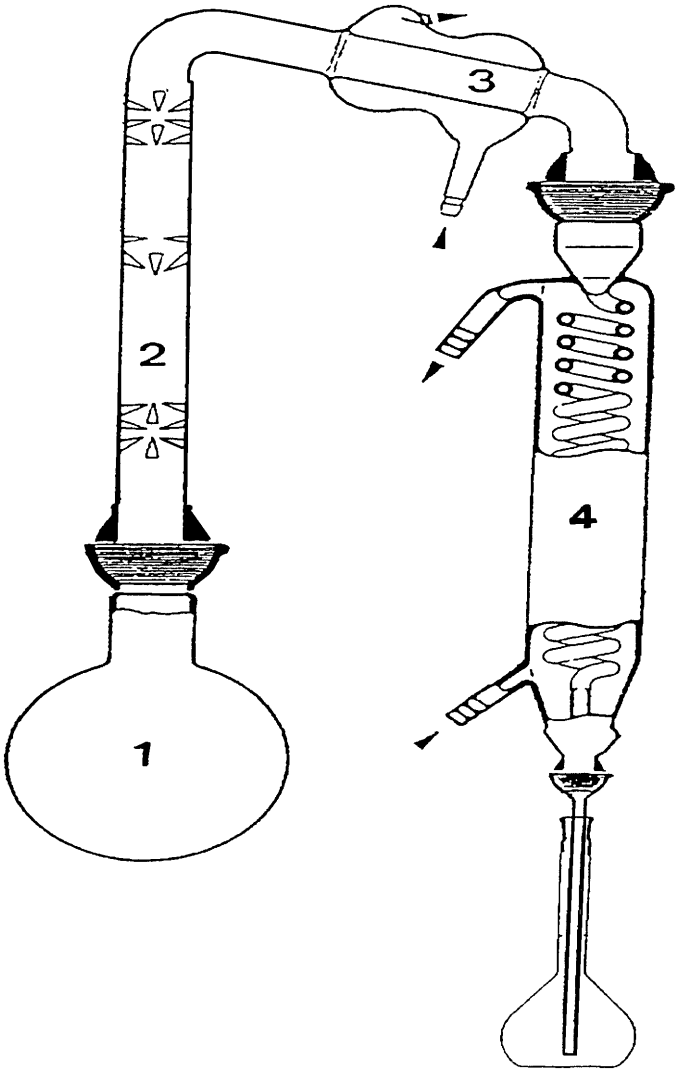
Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	16
Ilość próbek	6

Próbki	A	B	C	D	E	F
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	12	10	11	12	11	9
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	—	2	1	-	1	2
Ilość akceptowanych wyników	24	20	22	24	22	18
Wartość średnia($\bar{x}$)()% obj.	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51*			43,09*	45,89*	63,44*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr)% obj.	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Granica powtarzalności (r) w% obj.	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR)% obj.	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Granica odtwarzalności (R) w % obj.	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

▼B

Rodzaje próbek
A Likier owocowy; poziom rozdzielony*.
B Brandy; ślepe duplikaty.
C Whisky; ślepe duplikaty.
D Grappa; poziom rozdzielony*.
E Aquavit; poziom rozdzielony*.
F Rum; poziom rozdzielony*.

▼B



Urządzenie destylacyjne do pomiaru rzeczywistej zawartości alkoholu objętościowo w wyrobach spirytusowych.

1. 1-litrowa kolba okrągłodenna z normalizowanym kulistym złączem szlifowym.
2. 20-cm kolumna rektyfikacyjna Vigreux.
3. prosty skraplacz Westa o długości 10 cm.
4. 40-cm wężownica chłodząca.

▼B

II. OZNACZANIE OGÓLNEGO SUCHEGO EKSTRAKTU W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH PRZY WYKORZYSTANIU ANALIZY GRAWIMETRYCZNEJ

1. **Zakres**

Rozporządzenie (EWG) nr 1576/89 przewiduje niniejszą metodę wyłącznie dla aquavit, dla którego suchy ekstrakt jest ograniczony do 15g/l.

2. **Odniesienia normatywne**

ISO 3696:1987: Woda wykorzystywana w laboratorium analitycznym – specyfikacja oraz metody do badań.

3. **Definicja**

Ogólny suchy ekstrakt lub ogólna sucha masa obejmuje wszelkie substancje nielotne w określonych warunkach fizycznych.

4. **Zasada**

Ważenie pozostałości po wyparowaniu alkoholu w łaźni wodnej oraz osuszenie w suszarce.

5. **Aparatura i wyposażenie**

5.1. Płaskodenna cylindryczna szalka do odparowywania o średnicy 55 mm.

5.2. Łaźnia wodna.

5.3. 25 ml pipeta, klasy A.

5.4. Suszarka.

5.5. Eksykator.

5.6. Waga laboratoryjna o dokładności do 0,1 mg.

6. **Pobieranie próbek i próbki**

Próbki są przechowywane przed analizą w temperaturze pokojowej.

7. **Procedura**

7.1. Wprowadzić pipetą 25 ml alkoholu zawierającego mniej niż 15 g/l suchej masy do wcześniej zważonej płaskodennej cylindrycznej szalki do odparowywania o średnicy 55 mm. W trakcie pierwszej godziny odparowywania szalka do odparowywania umiejscowiona jest na pokrywie łaźni wodnej tak by płyn się nie gotował, gdyż mogłoby to spowodować straty poprzez rozpryskiwanie. Pozostawić na godzinę więcej w bezpośrednim kontakcie z gotującą się wodą łaźni wodnej.

7.2. Zakończyć suszenie poprzez umiejscowienie szalki do odparowywania w suszarce od temperaturze 105 °C ± 3 °C na dwie godziny. Pozwolić, by szalka do odparowywania ostygła w eksykatorze i zważyć szalkę do odparowywania wraz z zawartością

8. **Obliczenia**

Masa pozostałości przemnożona przez 40 jest równa suchej masie zawartej w alkoholach i musi być wyrażona w g/l do jednego miejsca po przecinku.

9. **Charakterystyka wydajnościowa metody (precyzja)**

9.1 Statystyczne wyniki testów międzylaboratoryjnych

Poniższe dane zostały uzyskane ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami [1] [2].

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	10
Ilość próbek	4

Próbki	A	B	C	D

▼B

Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	9	9	8	9
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	1	1	2	—
Ilość akceptowanych wyników	18	18	16	18
Wartość średnia($\bar{x}$)() g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDt) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Granica powtarzalności (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Granica odtwarzalności (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
C Rum; poziom rozdzielony.
B Grappa; poziom rozdzielony.
D Aquavit; poziom rozdzielony.

▼B

III. OZNACZANIE SUBSTANCJI LOTNYCH I METANOLU W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH

III.1. UWAGI OGÓLNE

1. **Definicje**

Rozporządzenie (EWG) nr 1576/89 określa minimalne poziomy składników lotnych innych niż etanol i metanol dla serii napojów spirytusowych (rumu, wyrobów alkoholowych pochodzenia winnego, alkoholów owocowych itp.). Wyłącznie dla serii tych alkoholi, te poziomy są tradycyjnie uważane za równoważne do sumy stężeń:

1. kwasów lotnych wyrażonych jako kwas octowy;

2. aldehydów wyrażonych jako etanal poprzez sumowanie etanalu (aldehydu octowego) i frakcji etanalowej zawartej w 1,1-dietoksyetanie (acetalu);

3. następujących wyższych alkoholi: propan-1-olu, butan-1-olu, 2-metylopropan-1-olu oznaczanych jako oddzielne alkohole oraz 2-metylobutan-1-olu i 3-metylobutan-1-olu oznaczane jako oddzielne alkohole lub jako suma dwóch;

4. octanu etylu.

Konwencjonalne metody oznaczania składników lotnych są następujące:

— kwasy lotne poprzez oznaczenie kwasowości lotnej,

— aldehydy (etanal oraz acetal), octan etylu oraz alkohole oznaczane przy pomocy chromatografii gazowej (GPC).

2. **Analiza składników lotnych przy pomocy chromatografii gazowej**

Oznaczenie chromatografią gazową składników lotnych innych niż te, które zostały określone powyżej może być w szczególności interesujące jako środek do oznaczania zarówno pochodzenia surowców użytych do destylacji oraz faktycznych warunków destylacji.

Niektóre wyroby spirytusowe zawierają inne składniki lotne, takie jak składniki aromatyczne, które są charakterystyczne dla surowców używanych do uzyskania alkoholu, zapachu napoju spirytusowego oraz specjalnych właściwości przygotowywania alkoholu. Składniki te są ważne do oceny wymogów określonych w rozporządzeniu (EWG) nr 1576/89.

III.2. OZNACZENIE POKREWNYCH ZWIĄZKÓW LOTNYCH: ALDEHYDÓW, WYŻSZYCH ALKOHOLI, OCTANU ETYLU ORAZ METANOLU PRZY WYKORZYSTANIU CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

1. **Zakres**

Niniejsza metoda jest właściwa do wykorzystania przy oznaczaniu 1,1-dwuetoksyetanu (acetalu), 2-metylobutan-1-olu (aktywnego alkoholu amylowego), 3-metylobutan-1-olu (alkoholu izoamylowego), metanolu (alkoholu metylowego), etanianu etylu (octan etylu), butan-1-olu, (n-butanolu), butan-2-olu (sec-butanolu), 2-metylopropan-1-olu (alkoholu izobutylowego), propan-1-olu (n-propanolu) oraz etanalu (aldehydu octowego) w napojach spirytusowych przy wykorzystaniu chromatografii gazowej. W metodzie wykorzystuje się wewnętrzny wzorzec, na przykład pentan-3-ol. Stężenia analitów wyrażone są w gramach na 100 litrów alkoholu bezwodnego; zawartość alkoholu w produkcie musi zostać określona przed analizą. Napoje spirytusowe, które mogą być analizowane przy pomocy tej metody, obejmują whisky, brandy, rum, winiaki, alkohole owocowe oraz grappa.

2. **Odniesienia normatywne**

ISO 3696:1987: Woda wykorzystywana w laboratorium analitycznym – specyfikacja oraz metody do badań.

3. **Definicja**

Pokrewne są to związki lotne utworzone z linii etanolu w trakcie fermentacji, destylacji oraz dojrzewania napojów spirytusowych.

▼B

4. **Zasada**

Związki pokrewne w napojach spirytusowych są określane poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie napoju spirytusowego, lub właściwie rozcieńczonego napoju spirytusowego, do układu chromatografu gazowego (GC). Odpowiedni wewnętrzny wzorzec jest dodawany do napoju spirytusowego przez wstrzyknięcie. Pokrewne są rozdzielane stosując programowanie temperatury do właściwej kolumny i wykrywane przy pomocy detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID). Zawartość każdego ze związków pokrewnych określone jest w odniesieniu do wewnętrznego wzorca na podstawie współczynnika odpowiedzi, który jest uzyskany w trakcie kalibracji w tych samych warunkach chromatograficznych jak te, które były w trakcie analizy napoju spirytusowego.

5. **Odczynniki i materiały**

O ile nie ustalono inaczej, stosować wyłącznie odczynniki o czystości większej niż 97 %, zakupione wraz certyfikatem czystości od akredytowanego przez ISO dostawcy, wolne od innych związków pokrewnych w teście rozcieńczalności (może być to potwierdzone poprzez wstrzyknięcie pojedynczego wzorca pokrewnego w testowym rozcieńczeniu wykorzystując warunki GC, które określono w 6.4) i wyłącznie wodę o przynajmniej 3 stopniu czystości, zgodnie z definicją ISO 3696. Acetal oraz aldehyd octowy muszą być przechowywane w ciemności w temperaturze <5 °C, wszystkie pozostałe odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze pokojowej.

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

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

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

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

5.5. Dopuszczalne wzorce wewnętrzne: pentan-3-ol (CAS 584-02-01), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-metylopentan-1-ol (CAS 626-89-1) lub pelargonian metylu (CAS 1731-84-6).

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

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

5.8. Octan etylu (CAS 141-78-6).

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

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

5.11. Aldehyd octowy (CAS 75-07-0).

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

5.13. Roztwór etanolu o 40 % obj.

W celu przygotowania roztworu etanolu 400 ml/l, wlać 400 ml etanolu (ppkt. 5.1) do kolby pomiarowej o pojemności 1 litra, dopełnić wodą destylowaną i wymieszać.

5.14. Przygotowanie i przechowywanie roztworów wzorcowych (procedura wykorzystywana dla potwierdzonych metod).

Wszystkie roztwory wzorcowe muszą być przechowywane w temperaturze <5 °C i być na nowo przygotowywane co miesiąc. Zaleca się zapisywanie mas składników i roztworów w przybliżeniu do 0,1 mg.

5.14.1. Roztwór wzorcowy – A

Wprowadzić pipetą następujące odczynniki do 100 ml kolby pomiarowej, zawierającej w przybliżeniu 60 ml roztworu etanolu (ppkt. 5.13) w celu ograniczenia wyparowywania składników, dopełnić do objętości roztworu etanolu (ppkt. 5.13) i dokładnie wymieszać. Zanotować wagę kolby, każdego dodanego składnika oraz ogólną końcową wagę składników.

Składnik	Objętość (ml)
Metanol (5.2)	3,0

▼B

Propan-1-ol (5.3)	3,0
2-metylopropan-1-ol (5.4)	3,0
2-metylobutan-1-ol (5.6)	3,0
3-metylobutan-1-ol (5.7)	3,0
Octan etylu (5.8)	3,0
Butan-1-ol (5.9)	3,0
Butan-2-ol (5.10)	3,0
Aldehyd octowy (5.11)	3,0
Acetal (5.12)	3,0

Uwaga 1: Zaleca się dodanie acetalu oraz aldehydu octowego na końcu w celu ograniczenia strat w wyniku parowania.

5.14.2. Roztwór wzorcowy – B

Wprowadzić pipetą 3 ml pentan-3-olu lub innego odpowiedniego wzorca wewnętrznego (ppkt. 5.5) do 100 ml kolby pomiarowej, zawierającej w przybliżeniu 80 ml roztworu etanolu (ppkt. 5.13), dopełnić do objętości roztworem etanolu (ppkt. 5.13) oraz dokładnie wymieszać.

Zanotować wagę kolby, wagę pentan-3-olu lub innego dodanego wewnętrznego wzorca oraz końcową wagę składników.

5.14.3. Roztwór wzorcowy – C

Wprowadzić pipetą 1 ml roztworu A (ppkt. 5.14.1) oraz 1 ml roztworu B (ppkt. 5.14.2) do 100 ml kolby pomiarowej zawierającej w przybliżeniu 80 ml roztworu etanolu (ppkt. 5.13), dopełnić do objętości roztworem etanolu (ppkt. 5.13) oraz dokładnie wymieszać.

Zanotować wagę kolby, każdego dodanego składnika oraz końcową wagę składników.

5.14.4. Roztwór wzorcowy – D

W celu zapewnienia ciągłości analitycznej, przygotować wzorce kontroli jakości, wykorzystując uprzednio przygotowany wzorzec A (ppkt. 5.14.1). Wprowadzić pipetą 1 ml roztworu A (ppkt. 5.14.1) do 100 ml kolby pomiarowej zawierającej w przybliżeniu 80 ml roztworu etanolu (ppkt. 5.13), dopełnić do objętości roztworem etanolu (ppkt. 5.13) i dokładnie wymieszać.

Zanotować wagę kolby, każdego dodanego składnika oraz końcową wagę składników.

5.14.5. Roztwór wzorcowy – E

Wprowadzić pipetą 10 ml roztworu B (ppkt. 5.14.2) do 100 ml kolby pomiarowej zawierającej w przybliżeniu 80 ml roztworu etanolu, dopełnić do objętości roztworem etanolu (ppkt. 5.13) i dokładnie wymieszać.

Zanotować wagę kolby, każdego dodanego składnika oraz końcową wagę składników.

5.14.6. Roztwory wzorcowe wykorzystywane do sprawdzenia zgodności odpowiedzi FID

Do oddzielnej 100 ml kolby pomiarowej, zawierającej w przybliżeniu 80 ml etanolu (ppkt. 5.13), wprowadzić pipetą 0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 roztworu A (ppkt. 5.14.1) oraz 1 ml roztworu B (ppkt. 5.14.2), dopełnić do objętości roztworem etanolu (ppkt. 5.13) i dokładnie wymieszać.

Zanotować wagę kolby, każdego dodanego składnika oraz końcową wagę składników.

5.14.7. Roztwór wzorcowy QC

Wprowadzić pipetą 9 ml roztworu wzorcowego D (ppkt. 5.14.4) oraz 1 ml roztworu standardowego E (ppkt. 5.14.5) do naczynka wagowego i dokładnie wymieszać.

▼B

Zanotować wagę kolby, każdego dodanego składnika oraz końcową wagę składników.

6. **Aparatura i wyposażenie**

6.1. Aparatura zdolna do mierzenia gęstości i zawartości alkoholu.

6.2. Waga analityczna, zdolna do mierzenia z dokładnością do czterech miejsc dziesiętnych.

6.3. Chromatograf gazowy z programowaniem temperatury, zaopatrzony w płomieniowy detektor jonizacji oraz integrator lub inny system do obsługiwania danych zdolny do mierzenia powierzchni pików lub wysokości pików.

6.4. Kolumna(-y) chromatografu gazowego zdolna(-e) do rozdzielania analitów, których minimalna rozdzielczość między indywidualnymi składnikami (innymi niż 2-metylobutan-1-ol oraz 2-metylobutan-1-ol) wynosi przynajmniej 1.3.

Uwaga 2: Przedstawione poniżej kolumny oraz warunki GC są dobrym przykładem:

1. Szczelina oddzielacza 1 m x 0,32 mm średnicy wewnętrznej, połączona z kolumną CP-WAX 57 CB 50 m x 0,32 mm średnicy wewnętrznej 0,2 μm grubości błony (stabilizowany glikol polietylenowy) wraz kolumną Carbowax 400 50 m x 0,32 mm średnicy wewnętrznej 0,2 μm grubość błony. (Kolumny są połączone przy wykorzystaniu połączeń dociskowych)

Gaz nośny oraz ciśnienie:	Hel (135 kPa)
Temperatura kolumny:	35 °C przez 17 min, 35–70 °C w 12 °C/min, utrzymanie 70 °C przez 25 min.
Temperatura wtryskiwacza:	150 °C
Temperatura detektora	250 °C
Objętość wstrzyknięcia:	1 μl, rozdzielone 20 do 100:1

2. Szczelina oddzielacza 1 m x 0,32 mm średnicy wewnętrznej, połączona z kolumną CP-WAX 57 CB 50 m x 0,32 mm średnicy wewnętrznej 0,2 μm grubość błony (stabilizowany glikol polietylenowy) (Szczelina oddzielacza połączona jest przy wykorzystaniu połączeń dociskowych).

Gaz nośny oraz ciśnienie:	Hel (65 kPa)
Temperatura kolumny:	35 °C przez 10 min, 35–110 °C w 5 °C/min, 110–190 °C w 30 °C/min, utrzymanie 190 °C przez 2 min.
Temperatura wtryskiwacza:	260 °C
Temperatura detektora	300 °C
Objętość wstrzyknięcia:	1 μl, rozdzielone 55:1

3. Kolumna z wypełnieniem (5 % CW 20 M, Carbopak B), 2 m x 2 mm średnicy wewnętrznej.

Temperatura kolumny:	65 °C przez 4 min, 65–140 °C w 10 °C/min, 140–150 °C w 5 °C/min, utrzymanie 150 °C przez 3 min.
Temperatura wtryskiwacza:	65 °C
Temperatura detektora	200 °C

▼B

Objętość wstrzyknięcia: 1 µl.

7. **Pobieranie próbek i próbki**

7.1. Próbki laboratoryjne

Po otrzymaniu mierzona jest zawartość alkoholu w każdej próbce (ppkt. 6.1).

8. **Procedura (wykorzystywana przy potwierdzonych metodach)**

8.1. Porcja do badania

8.1.1. Zważyć właściwie zabezpieczone naczynko wagowe i zanotować wagę.

8.1.2. Wprowadzić pipetą 9 ml próby laboratoryjnej do naczynka i zanotować wagę (MPRÓBKI).

8.1.3. Dodać 1 ml roztworu wzorcowego E (ppkt. 5.14.5) i zanotować wagę (MWW).

8.1.4. Wstrząsnąć energicznie materiał do badania (przynajmniej 20 obrotów). Próbki muszą być przechowywane w temperaturze mniejszej niż 5 °C przed analizą w celu zminimalizowania jakichkolwiek strat substancji lotnych.

8.2. Ślepa próba

8.2.1. Wykorzystując wagę o dokładności do czterech miejsc dziesiętnych (ppkt. 6.2) zważyć właściwie zabezpieczone naczynko wagowe i zanotować wagę.

8.2.2. Wprowadzić pipetą 9 ml 400 ml/l roztworu etanolu (ppkt. 5.13) do naczynka i zanotować wagę.

8.2.3. Dodać 1 ml roztworu wzorcowego E (ppkt. 5.14.5) i zanotować wagę.

8.2.4. Wstrząsnąć energicznie materiał do badania (przynajmniej 20 obrotów). Próbki muszą być składowane w temperaturze mniejszej niż 5 °C przed analizą w celu zminimalizowania jakichkolwiek strat substancji lotnych.

8.3. Badanie wstępne

Wstrzyknąć roztwór wzorcowy C (ppkt. 5.14.3) w celu zapewnienia, że anality są rozdzielane z minimalną rozdzielczością 1.3 (z wyjątkiem 2-metylobutan-1-olu oraz 2-metylobutan-1-olu).

8.4. Kalibracja

Zaleca się sprawdzanie kalibracji przy wykorzystaniu następującej procedury. Zapewnić, że odpowiedź jest liniowa w kolejnych analizach w potrojeniu każdego z wzorcowych roztworów do liniowości (ppkt. 5.14.6) zawierających wewnętrzny wzorzec (WW). Z powierzchni pików lub wysokości pików integratora obliczyć współczynnik R dla każdego związku pokrewnego i sporządzić wykres zależności R od stosunku stężeń związku pokrewnego do wzorca wewnętrznego (WW), C. Powinno uzyskać się liniowy wykres o współczynniku korelacji przynajmniej 0,99.

$$R = \frac{\text{Powierzchnia piku lub wierzcholek pochodnych}}{\text{Powierzchnia piku lub wierzcholek WW}}$$

$$C = \frac{\text{Zawartość pochodnych } (\mu g/g)}{\text{Zawartość WW } (\mu g/g)}$$

8.5. Oznaczanie

Wstrzyknąć roztwór wzorcowy C (ppkt. 5.14.3) oraz dwa roztwory wzorcowe QC (ppkt. 5.14.7). Postępować z nieznanymi próbkami (przygotowanymi zgodnie z ppkt. 8.1 i 8.2) dodając jeden wzorzec QC co 10 próbek w celu zapewnienia stabilności analitycznej. Wstrzyknąć jeden roztwór standardowy C (ppkt. 5.14.3) co 5 próbek.

▼B

9. **Obliczenia**

Może zostać wykorzystany automatyczny system przetwarzania danych, pod warunkiem, że dane są sprawdzane zgodnie z zasadami opisanymi w poniższej metodzie.

Zmierzyć zarówno powierzchnię pików lub wysokości pików dla pokrewnych związków oraz piki wewnętrznych wzorców.

9.1. Obliczenie współczynnika odpowiedzi.

Z chromatografu po wstrzyknięciu roztworu wzorcowego C (ppkt. 5.14.3), obliczyć współczynnik odpowiedzi dla każdego pokrewnego związku, wykorzystując równanie (1).

$$\text{Współczynnik odpowiedzi} = \frac{\text{Powierzchnie pików lub wysokość WW}}{\text{Powierzchnie pików lub wysokość pochodnych}} \times \frac{\text{zawart. poch. (µg/g)}}{\text{zawart. WW (µg/g)}}$$

gdzie:

WW = Wzorzec Wewnętrzny

Stęż. Poch. = zawartość związków pokrewnych w roztworze C (ppkt. 5.14.3)

Stęż. WW = zawartość wzorca wewnętrznego w roztworze C (ppkt. 5.14.3).

9.1.2. Analiza próbki

Wykorzystując równanie (2) poniżej, obliczyć zawartość każdego ze związków pokrewnych w próbkach.

(2) zawartość każdego ze związków pokrewnych

$$\frac{\text{Powierzchnie pików lub wysokość pochodnych}}{\text{Powierzchnie pików lub wysokość WW}} \times \frac{M_{WW}\,(g)}{M_{PRÓBKI}\,(g)} \times \text{zawart. WW (µg/g)} \times \text{WO}$$

gdzie:

$M_{PRÓBKI}$ = waga próbki (ppkt. 8.1.2);

M_{WW} = waga wzorca wewnętrznego (ppkt. 8.1.3);

Stęż. WW = zawartość wzorca wewnętrznego w roztworze E (ppkt. 5.14.5);

WO = współczynnik odpowiedzi obliczony przy pomocy równania 1.

9.1.3. Analiza roztworu wzorcowego kontroli jakości

Wykorzystując równanie (3) poniżej, obliczyć procent odzyskania docelowych wartości dla każdego związku pokrewnego we wzorcu kontroli jakości (ppkt. 5.14.7):

$$(3)\ \%\ \text{odzyskania próbki QC} = \frac{\text{zawartość analitów we wzorcu QC}}{\text{zawartość analitów w roztworze D}} \times 100$$

Zawartość analitów we wzorcu QC obliczana jest przy wykorzystaniu przedstawionych wyżej równań (1) i (2).

9.2. Końcowa prezentacja wyników

Wyniki przekształca się z µ/g do g na 100 litrów alkoholu bezwodnego dla próbek, wykorzystując równanie (4):

(4) Zawartość w g na 100 litrów alkoholu bezwodnego =

Stęż (µg/g) x ρ x 10/(zawartość (% obj.) x 1 000)

gdzie ρ = gęstość w kg/m^3.

Wyniki podaje się do 3 cyfr znaczących i maksymalnie do jednego miejsca dziesiętnego, np.: 11,4 g na 100 l alkoholu bezwodnego.

▼B

10. **Zapewnienie jakości oraz kontrole (przeprowadzane dla potwierdzonych metod)**

Wykorzystując równanie (2) podane wyżej, obliczyć zawartość każdego związku pokrewnego we wzorcowych roztworach kontroli jakości przygotowanych zgodnie z procedurami w ppkt 8.1.1-8.1.4. Wykorzystując równanie (3), obliczyć procent odzyskania z wartości docelowych. Jeśli analizowane wyniki są w granicach ± 10 % ich wartości teoretycznej dla każdego związku pokrewnego, można przeprowadzać analizę. Jeśli nie, należy przeprowadzić dochodzenie w celu stwierdzenia powodu niezgodności oraz podjąć właściwe czynności zaradcze.

11. **Charakterystyka wydajnościowa metody (precyzja)**

Wyniki statystyczne testów międzylaboratoryjnych: poniższe tabele podają wartości następujących składników: etanolu, octanu etylu, acetalu, etanalu łącznie, metanolu, butan-2-olu, propan-1-olu, 2-metylopropan-1-olu, 2-emtylobutan-1-olu, 3-metylobutan-1-olu.

Poniższe dane zostały uzyskane ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	etanal

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	28	26	27	27	28
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	2	4	3	3	2
Ilość akceptowanych wyników	56	52	54	54	56
Wartość średnia($\bar{x}$)() µ/g	63,4	71,67	130,4	38,4	28,6
				13,8*	52,2*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Granica powtarzalności (r) µ/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	12	14	22	6,8	8,9
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Granica odtwarzalności (R) µ/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
D Whisky; poziom rozdzielony*.
E Rum; poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	oc tan et ylu

Próbki	A	B	C	D	E

▼B

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	24	24	25	24	24
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	2	2	1	2	2
Ilość akceptowanych wyników	48	48	50	48	48
Wartość średnia($\bar{x}$)() µ/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8*	99,1 117,0*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Granica powtarzalności (r) µ/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Granica odtwarzalności (R) µ/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
D Whisky; poziom rozdzielony*.
E Rum; poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	acetal

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	20	21	22	17	21
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	4	3	2	4	3
Ilość akceptowanych wyników	40	42	44	34	42
Wartość średnia($\bar{x}$)() µ/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60*	15,1 28,3*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Granica powtarzalności (r) µ/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Granica odtwarzalności (R) µ/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Rodzaje próbek
A Brandy, ślepe duplikaty.
B Kirsch, ślepe duplikaty.
C Grappa, ślepe duplikaty.
D Whisky, poziom rozdzielony*.
E Rum, poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997

▼B

Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	ogółem etanal

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	23	19	22	21	22
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	1	5	2	3	2
Ilość akceptowanych wyników	46	38	44	42	44
Wartość średnia(ñ)() µ/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8*	32,7 61,8*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Granica powtarzalności (r) µ/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Granica odtwarzalności (R) µ/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Rodzaje próbek
A Brand; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
D Whisky; poziom rozdzielony*.
E Rum; poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	Metanol

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	26	27	27	28	25
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	4	3	3	1	4
Ilość akceptowanych wyników	52	54	54	56	50
Wartość średnia($\bar{x}$) () µ/g	319,8	2245	1326	83,0 61,5*	18,6 28,9*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Granica powtarzalności (r) µ/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	13	99	60	4,5	2,8
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Granica odtwarzalności (R) µ/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

▼B

Próbki	A	B	C	D	E

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
D Whisky; poziom rozdzielony*.
E Rum; poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	4
Analit	butan-2-ol

Próbki	A	B	C	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	21	27	29	22
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	4	3	1	3
Ilość akceptowanych wyników	42	54	58	44
Wartość średnia($\bar{x}$)() µ/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Granica powtarzalności (r) µ/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	0,89	13	3,2	0,87
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Granica odtwarzalności (R) µ/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
E Rum; poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	propan-1-ol

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	29	27	27	29	29
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	2	4	3	2	2
Ilość akceptowanych wyników	58	54	54	58	58
Wartość średnia($\bar{x}$)() µ/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3*	177,1 222,1*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Granica powtarzalności (r) µ/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1

▼B

Próbki	A	B	C	D	E
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Granica odtwarzalności (R) µ/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
D Whisky; poziom rozdzielony*.
E Rum; poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	propan-1-ol

Próbki	A	B	C
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	20	22	22
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	4	4	6
Ilość akceptowanych wyników	40	44	44
Wartość średnia($\bar{x}$)() µ/g	3,79	5,57	7,54
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	0,43	0,20	0,43
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	11,2	3,6	5,6
Granica powtarzalności (r) µ/g	1,1	0,6	1,2
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	0,59	0,55	0,82
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	15,7	9,8	10,8
Granica odtwarzalności (R) µ/g	1,7	1,5	2,3

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	2-metylopropan-l-ol

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	28	31	30	26	25
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	3	0	1	5	6
Ilość akceptowanych wyników	56	62	60	52	50
Wartość średnia($\bar{x}$)(X) µ/g	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8*	133,87*

▼B

Próbki	A	B	C	D	E
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Granica powtarzalności (r) µ/g.	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Granica odtwarzalności (R) µ/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
D Whisky; poziom rozdzielony*.
E Rum; poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	2-methylobutan-1-ol

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	25	26	25	27	25
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	3	2	3	1	2
Ilość akceptowanych wyników	50	52	50	54	50
Wartość średnia($\bar{x}$)() µ/g	113,0	48,3	91,6	72,1	39,5
				45,2*	61,5*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Granica powtarzalności (r) µ/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Granica odtwarzalności (R) µ/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
D Whisky; poziom rozdzielony*.
E Rum, poziom rozdzielony*.

Rok testów międzylaboratoryjnych	1 997
Ilość laboratoriów	32
Ilość próbek	5
Analit	3 -metylobutan-1-ol

▼B

Próbki	A	B	C	D	E
Ilość laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych	23	23	24	27	21
Ilość wartości skrajnych (laboratoriów)	5	5	4	1	6
Ilość akceptowanych wyników	46	46	48	54	42
Wartość średnia($\bar{x}$)() µ/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4*	212,3 245,6*
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) µ/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Granica powtarzalności (r) µ/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) µ/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Granica odtwarzalności (R) µ/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Rodzaje próbek
A Brandy; ślepe duplikaty.
B Kirsch; ślepe duplikaty.
C Grappa; ślepe duplikaty.
D Whisky; poziom rozdzielony*.
E Rum; poziom rozdzielony*.

▼M1

V. ANETOL. OZNACZANIE TRANSANETOLU W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

1. **Zakres**

Metoda ta jest odpowiednia do oznaczania transanetolu w napojach alkoholowych z aromatem anyżkowym przy użyciu kapilarnej chromatografii gazowej.

2. **Odniesienia normatywne**

ISO 3696: 1987 Woda do zastosowań w laboratorium analitycznym – specyfikacje i metody testów (Water for analytical laboratory kuse – Specifications and test methods).

3. **Zasada**

Stężenie transanetolu w destylacie alkoholowym jest oznaczone metodą chromatografii gazowej (GC). Taka sama ilość wg normy wewnętrznej np. 4-alliloanizolu (estragolu), gdy estragol nie jest naturalnie obecny w próbce, zostaje dodana do próbki testowej i do referencyjnego roztworu transanetolu o znanym stężeniu, które zostają następnie rozcieńczone 45 % roztworem alkoholu etylowego i bezpośrednio wstrzyknięte do systemu GC. Dla likierów o dużej zawartości cukrów przed przygotowaniem próbki i analizą konieczna jest ekstrakcja.

4. **Odczynniki i materiały**

W czasie analizy należy używać jedynie odczynników o czystości przynajmniej 98 % i wody co najmniej klasy 3 według definicji ISO 3696.

Chemikalia referencyjne należy przechowywać w chłodnej temperaturze (4 °C), z dala od światła, w aluminiowych pojemnikach lub w butelkach dla odczynników z barwionego (oranżowego) szkła. Zaleca się zaopatrzenie zatyczek (szklanych korków) do butelek w aluminiowe uszczelki. Przed użyciem transanetol musi być „odtajony” ze stanu krystalicznego, ale w takich przypadkach jego temperatura nie może nigdy przewyższać 35 °C.

4.1. Etanol (alkohol etylowy) 96 % vol. (CAS 64–17–5)

4.2. 1-metoksy-4-(1-propenyl) benzen; (transanetol) (CAS 4180–23–8)

4.3. 4-allilanizol, (estragol) (CAS 140–67–0), proponowany wzorzec wewnętrzny (internal standard – IS)

4.4. Etanol (alkohol etylowy) 45 % vol.

Dodać 560 g wody destylowanej do 378 g etanolu 96 % vol.

4.5. Przygotowanie roztworu wzorcowego (mianowanego)

Wszystkie roztwory wzorcowe należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15 do 35 °C) z dala od światła, w aluminiowych pojemnikach lub w butelkach dla odczynników z barwionego (oranżowego) szkła. Zaleca się zaopatrzenie zatyczek (szklanych korków) do butelek w aluminiowe uszczelki.

Transanetol i 4-allilanizol są praktycznie nierozpuszczalne w wodzie, dlatego też konieczne jest ich rozpuszczenie w niewielkiej ilości 96 % etanolu (4.1) przed dodaniem 45 % etanolu (4.4).

Roztwory podstawowe muszą być świeżo przygotowywane każdego tygodnia.

4.5.1. Roztwór wzorcowy A

Roztwór podstawowy transanetolu (stężenie: 2 g/l)

Odważyć 40 mg transanetolu (4.2) w 20 ml kolbie pomiarowej (lub 400 mg w 200 ml itd..). Dodać trochę 96 % etanolu (4.1) i uzupełnić objętość przez dodanie 45 % vol. etanolu (4.4), dokładnie wymieszać.

4.5.2. Wzorzec wewnętrzny roztworu B

Roztwór podstawowy według wzorca wewnętrznego, np. estragol (stężenie: 2 g/l)

▼M1

Odważyć 40 mg transanetolu (4.3) w 20 ml kolbie pomiarowej (400 mg w 200 ml itd..). Dodać trochę 96 % etanolu (4.1) i uzupełnić objętość przez dodanie 45 % vol. etanolu (4.4), dokładnie wymieszać.

4.5.3. Roztwory stosowane do sprawdzenia reakcji linearnej detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID – flame ionization detector)

Na potrzeby analizy należy sprawdzić reakcję liniowości FID, biorąc pod uwagę zakres stężeń transanetolu w napojach alkoholowych od 0 g/l do 2,5 g/l. W procedurze analitycznej nieznane próbki napojów alkoholowych do analizy są rozcieńczane 10-krotnie (8.3). Dla warunków analizy przedstawionych w tej metodzie roztwory podstawowe odpowiadające stężeniom 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, i 0,25 g/l transanetolu w próbce do analizy przygotowuje się następująco: pobrać 0,5, 1, 1,5, 2, i 2,5 ml roztworu podstawowego A (4.5.1) i pipetować do oddzielnych 20 ml kolb pomiarowych; pipetować do każdej kolby 2 ml wzorca wewnętrznego roztworu B (4.5.2) i uzupełnić objętość przez dodanie 45 % vol. etanolu (4.4), dokładnie wymieszać.

Pusty roztwór (8.4) jest używany jako roztwór 0 g/l.

4.5.4. Roztwór wzorcowy C

Pobrać 2 ml roztworu wzorcowego A (4.5.1) i pipetować do 20 ml kolby pomiarowej, następnie dodać 2 ml wzorca wewnętrznego roztworu B (4.5.2) i uzupełnić objętość przez dodanie 45 % vol. etanolu (4.4), dokładnie wymieszać.

5. **Aparatura i wyposażenie**

5.1. Kapilarny chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) i integrator lub inne urządzenie do obróbki danych umożliwiające pomiar wartości w punkcie maksymalnym lub powierzchni piku, z automatycznym próbnikiem lub sprzętem umożliwiającym ręczne wstrzyknięcie próbki.

5.2. Wtryskiwacz wieloczęściowy/nierozdzielny

5.3. Na przykład chromatograficzna kolumna kapilarna:

Długość: 50 m

Średnica wewnętrzna: 0,32 mm

Grubość błonki (warstewki): 0,2 μm

Faza stacjonarna: FFAP – zmodyfikowany kwas tereftalowy glikol polietylenowy usieciowany porowaty polimer.

5.4. Zwykły sprzęt laboratoryjny: Wysokiej klasy wolumetryczne szkło laboratoryjne, waga analityczna (dokładność: ± 0,1 mg).

6. **Warunki chromatografii**

Rodzaj kolumny, jej wymiary, jak też warunki prowadzenia chromatografii gazowej powinny pozwolić na oddzielenie anetolu i wzorca wewnętrznego od siebie i od innych substancji zakłócających. Typowe warunki dla kolumny podanej w przykładzie 5.3 są następujące:

6.1. Gaz nośny: hel analityczny

6.2. Przepływ: 2 ml/min

6.3. Temperatura wtryskiwacza: 250 °C

6.4. Temperatura detektora: 250 °C

6.5. Stan temperatury pieca: izotermiczny, 180 °C, czas wykonania 10 minut

6.6. Objętość wstrzyknięcia: 1 μl, rozdział 1:40.

7. **Próbki**

Próbki należy przechowywać w temperaturze pokojowej, chronić przed światłem i zimnem.

▼M1

8. **Procedura**

8.1. Sortowanie próbek na obecność estragolu

W celu upewnienia się o niewystępowaniu w próbce estragolu pochodzenia naturalnego należy przeprowadzić ślepą próbę bez dodatku jakiegokolwiek wzorca wewnętrznego. Jeśli taka analiza wykaże występowanie estragolu pochodzenia naturalnego, należy wybrać inny wzorzec wewnętrzny (np. mentol).

Pipetować 2 ml próbki do 20 ml kolby pomiarowej i uzupełnić objętość przez dodanie 45 % vol. etanolu (4.4), dokładnie wymieszać.

8.2. Przygotowanie niewiadomych próbek

Pipetować 2 ml próbki do 20 ml kolby pomiarowej, a następnie dodać 2 ml wzorca wewnętrznego roztworu B (4.5.2) i uzupełnić objętość przez dodanie 45 % vol. etanolu (4.4), dokładnie wymieszać.

8.3. Próba ślepa

Pipetować 2 ml wzorca wewnętrznego roztworu B (4.5.2) do 20 ml kolby pomiarowej i uzupełnić objętość przez dodanie 45 % vol. etanolu (4.4), dokładnie wymieszać.

8.4. Badanie liniowości

Przed rozpoczęciem analizy należy sprawdzić liniowość reakcji płomieniowego detektora jonizacyjnego (FID) poprzez kolejne, prowadzone potrójnie badania wzorcowych roztworów liniowości (4.5.3).

Od wartości uzyskanych z integratora dla punktu maksymalnego lub powierzchni piku dla każdego wstrzyknięcia sporządzić wykres stężenia ich roztworu macierzystego w g/l w zależności od współczynnika R dla każdego wstrzyknięcia.

R = wartość w punkcie maksymalnym lub powierzchni piku dla transanetolu, podzielone przez odpowiadające wartości dla estragolu.

W rezultacie powinien powstać wykres liniowy.

8.5. Oznaczenie

Wstrzyknąć ślepy roztwór (8.3), dalej roztwór wzorcowy C (4.5.4), a następnie jeden z wzorców liniowości (4.5.3) działający jako próbka kontroli jakości (może być wybrany w odniesieniu do prawdopodobnego stężenia transanetolu w próbce niewiadomej), po czym pięć niewiadomych (8.2). Dla uzyskania stabilności analitycznej po każdych pięciu niewiadomych próbkach wstawić próbkę liniowości (kontroli jakości).

9. **Obliczanie współczynnika reakcji**

Przeprowadzić pomiary obszarów piku (przy pomocy integratora lub innego systemu obliczania danych) lub wysokości piku (całkowanie, integracja ręczna) dla transanetolu i pików wzorca wewnętrznego.

9.1. Obliczanie współczynnika reakcji (RF_i)

Współczynnik RFi oblicza się następująco:

$RF_i = (C_i/\text{obszar lub wysokość i})*(\text{obszar lub wysokość}_{is}/C_{is})$

gdzie:

C_i oznacza stężenie transanetolu w roztworze wzorcowym (mianowanym) A (4.5.1)

C_{is} oznacza stężenie wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym B (4.5.2)

obszar_i oznacza obszar (lub wysokość) piku transanetolu

obszar_{is} oznacza obszar (lub wysokość) piku wzorca wewnętrznego

RF_i oblicza się z pięciu próbek roztworu C (4.5.4).

9.2. Analiza roztworów do testów reakcji liniowości

Wstrzyknąć roztwory do testów reakcji liniowości (4.5.3).

▼M1

9.3. Analiza próbki

Wstrzyknąć roztwór niewiadomej próbki (8.2).

10. **Obliczanie wyników**

Wzór na obliczanie stężenia transanetolu jest następujący:

$c_i = C_{is}$ * (obszar lub wysokośći/obszar lub wysokośćis)*RF_i

gdzie:

c_i	oznacza niewiadome stężenie transanetolu
C_{is}	oznacza stężenie wzorca wewnętrznego w niewiadomym (4.5.2)
Obszar lub wysokość$_i$	stanowi obszar lub wysokość piku transanetolu
Obszar lub wysokość$_{is}$	stanowi obszar lub wysokość piku wzorca wewnętrznego
RF_i	stanowi współczynnik reakcji (obliczany jak w 9.1)

Stężenie transanetolu jest wyrażone w gramach na jeden litr, z dokładnością do jednego miejsca dziesiętnego.

11. **Zapewnienie i kontrola jakości**

Chromatogramy powinny zapewniać oddzielenie anetolu i wzorca wewnętrznego od siebie i od innych substancji kolidujących. Wartość RF_i jest obliczana z wyników pięciu wstrzyknięć roztworu C (4.5.4). Jeśli współczynnik zmienności (CV % = (odchylenie standardowe/średnie)*100)) wynosi ± 1 %, przeciętna wartość RF_i może być przyjęta.

Powyższą metodę należy stosować do obliczania stężenia transanetolu w próbce wybranej do kontroli jakości z roztworów kontroli liniowości (4.5.3).

Jeśli średnie obliczone wyniki z analizy roztworu kontroli liniowości wybranego do próbki wewnętrznej kontroli jakości (IQC) są w granicach ± 2,5 % ich wartości teoretycznej, wówczas wyniki dla próbek niewiadomych mogą być przyjęte.

12. **Traktowanie próbek napojów alkoholowych zawierających znaczną ilość cukru i próbki likieru przed analizą metodą chromatografii gazowej (GC).**

Ekstrakcja alkoholu z napoju alkoholowego zawierającego znaczną ilość cukru w celu umożliwienia oznaczenia stężenia transanetolu za pomocą kapilarnej chromatografii gazowej.

12.1. Zasada

Pobiera się podwielokrotną część próbki likieru i dodaje się do niej wzorzec wewnętrzny w stężeniu równym stężeniu analitu (transanetolu) w likierze. Do tego dodaje się dodekanohydrat ortofosforanu sodowego i bezwodny siarczan amonowy. Otrzymana mieszanka zostaje dokładnie wstrząśnięta i schłodzona, a z wytworzonych w niej dwóch warstw zostaje usunięta górna warstwa alkoholu. Pobiera się podwielokrotną część tej warstwy alkoholu i rozcieńcza 45 % roztworem etanolu (4.4) (uwaga: na tym etapie nie dodaje się żadnego wzorca wewnętrznego, gdyż został on już dodany). Powstały roztwór zostaje poddany analizie metodą chromatografii gazowej.

12.2. Odczynniki i materiały

Podczas ekstrakcji należy używać jedynie odczynników o czystości powyżej 99 %.

12.2.1. Bezwodny siarczan amonu, (CAS 7783-20-2).

12.2.2. Ortofosforan sodowy dwuzasadowy, dodekanohydrat (CAS 10039-32-4).

12.3. Aparatura i wyposażenie

Kolby stożkowe, kolby rozdzielające, chłodziarka.

▼M1

12.4. Procedura

12.4.1. Sortowanie próbek na obecność estragolu

W celu upewnienia się o niewystępowaniu w próbce estragolu pochodzenia naturalnego należy przeprowadzić ślepą ekstrakcję (12.6.2) i analizę bez dodatku jakiegokolwiek wzorca wewnętrznego. Jeśli taka analiza wykaże występowanie estragolu pochodzenia naturalnego, należy wybrać inny wzorzec wewnętrzny.

12.4.2. Ekstrakcja

Do stożkowej kolby pipetować 5 ml 96 % etanolu (4.1), odważyć do niej 50 mg wzorca wewnętrznego (4.3) i dodać 50 ml próbki. Dodać 12 g bezwodnego siarczanu amonu (12.2.1) i 8.6 g dodekahydratu dwuzasadowego ortofosforanu sodu (12.2.2). Zatkać kolbę stożkową.

Wstrząsać kolbę co najmniej przez 30 minut. Można stosować mechaniczne urządzenie wstrząsające, oprócz pokrytego teflonem magnetycznego pręta mieszadłowego, gdyż teflon absorbuje pewną cześć analitu (składnika wykrywanego). Należy zwrócić uwagę na fakt niecałkowitego rozpuszczenia dodanych soli.

Umieścić zakorkowaną kolbę w lodówce w temp. T < 5 C na co najmniej dwie godziny.

Po tym czasie powinny się wytworzyć dwie wyraźne płynne warstwy i sucha pozostałość. Warstwa alkoholu powinna być wyraźnie klarowna, w przeciwnym razie należy umieścić kolbę z powrotem w lodówce, aż do uzyskania wyraźnego oddzielenia.

Gdy warstwa alkoholu jest już odpowiednio klarowna, należy ostrożnie bez naruszania warstwy wodnej pobrać analit (np. 10 ml), umieścić w fiolce z oranżowego szkła i szczelnie zamknąć.

12.4.3. Przygotowanie ekstrahowanej próbki do analizy

Doprowadzić ekstrakt (12.4.2) do uzyskania temperatury pokojowej.

Pobrać 2 ml alkoholowej warstwy z ekstrahowanej i doprowadzonej do temperatury pokojowej próbki, pipetować do 20 ml kolby pomiarowej, uzupełnić objętość przez dodanie 45 % etanolu (4.4), dokładnie wymieszać.

12.5. Oznaczanie

Zachować procedurę przedstawioną w 8.5.

12.6. Obliczanie wyników

Przy obliczaniu wyników należy stosować następujący wzór:

$C_i = (m_{is}/V)^* \text{ (obszari/obszar is) } ^*RF_i$

gdzie:

m_{is} oznacza wagę pobranego (12.4.2) wzorca wewnętrznego (4.3) (w miligramach)

V oznacza objętość niewiadomej próbki (50 ml)

RF_i oznacza współczynnik reakcji (9.1)

$obszar_i$ oznacza obszar piku transanetolu

$obszar_{is}$ oznacza obszar piku wzorca wewnętrznego

Wyniki są podane w gramach na jeden litr, z dokładnością do jednego miejsca dziesiętnego.

12.7. Kontrola i zapewnienie jakości

Zachować procedurę przedstawioną w punkcie 11 powyżej.

13. **Charakterystyka wyników stosowanej metody (dokładność)**

Wyniki statystyczne badania międzylaboratoryjnego:

poniższe tabele podają wartości dla anetolu.

Poniższe dane zostały uzyskane z badania wyników międzynarodowej metody przeprowadzonego według ustalonych procedur międzynarodowych

▼M1

Rok badania międzylaboratoryjnego	1 998
Liczba laboratoriów	16
Liczba próbek	10
Analit	ane tol

Anyżówka (Pastis):

Próbki	A	B	C	D	E	F
Liczba laboratoriów pozostała po eliminacji wartości odstających	15	15	15	13	16	16
Liczba wartości odstających (laboratoriów)	1	1	1	3	–	–
Liczba przyjętych wyników	30	30	30	26	16	16
Średnia wartość g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	–	–
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	–	–
Granica powtarzalności (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	–	–
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Granica odtwarzalności (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Rodzaje próbki:

A anyżówka (pastis), ślepe duplikaty

B anyżówka (pastis), ślepe duplikaty

C anyżówka (pastis), ślepe duplikaty

D anyżówka (pastis), ślepe duplikaty

E anyżówka (pastis), pojedyncze duplikaty

F anyżówka (pastis), pojedyncze duplikaty

Inne aromatyzowane anyżem napoje alkoholowe:

Próbki	G	H	I	J
Liczba laboratoriów pozostała po eliminacji wartości odstających	16	14	14	14
Liczba wartości odstających (laboratoriów)	–	2	1	1
Liczba przyjętych wyników	32	28	28	28
Średnia wartość g/l	0,778 0,530*	1,742	0,351	0,599
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Granica powtarzalności (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Granica odtwarzalności (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Rodzaje próbek:

G ouzo, rozdzielone poziomy*

▼**M1**

H anyżowka, ślepe duplikaty

I aromatyzowany anyżkiem likier, duplikaty

J aromatyzowany anyżkiem likier, duplikaty.

▼M1

VI. KWAS LUKRECJOWY. OZNACZANIE KWASU LUKRECJOWEGO METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. **Zakres**

Metoda ta jest odpowiednia do oznaczania kwasu lukrecjowego w napojach alkoholowych aromatyzowanych anyżkiem z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Rozporządzenie (EWG) nr 1576/89 określa, że każdy aromatyzowany anyżkiem napój alkoholowy nazywany „pastis" musi zawierać 0,05 i 0,5 g kwasu lukrecjowego na litr.

2. **Odniesienia normatywne**

ISO 3696: 1987 Woda do zastosowań w laboratorium analitycznym – specyfikacje i metody testów (Water for analytical laboratory use – Specifications and test methods).

3. **Zasada**

Stężenie kwasu lukrecjowego(glycyrrhizic acid) oznacza się przy zastosowaniu wysokosprawnościowej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją promieniowania nadfioletowego (UV). Rozwór wzorcowy (mianowany) i próbka testowa są filtrowane i oddzielnie wstrzyknięte do systemu HPLC.

4. **Odczynniki i materiały**

Do analizy należy używać wyłącznie odczynników klasy HPLC, bezwodnego etanolu i wody klasy 3 według definicji ISO 3696.

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

4.2. Ammonium glycyrrhizinate, $C_{42}H_{62}O_{16} \cdot NH_3$ (sól amonowa kwasu lukrecjowego)

(Mol. Wt.: 839,98)(CAS 53956-04-0): czystość co najmniej 90 %

(Mol. Wt.: kwas lukrecjowy 822,94).

4.3. Kwas octowy lodowaty, CH_3COOH (CAS 64-19-7).

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

4.5. Etanol 50 % vol.

Dla 1 000 ml w temp. 20 °C:

— 96 % vol. etanol (4.1): 521 ml

— Woda (2.0): 511 ml.

4.6. Przygotowanie roztworów elucyjnych dla chromatografii HPLC

4.6.1. Rozpuszczalnik elucyjny A (przykład)

80 części (objętościowo) wody (2.0)

20 części (objętościowo) kwasu octowego (4.3).

Odgazowywać rozpuszczalnik elucyjny przez pięć minut

Uwaga: Jeśli używana woda nie była poddana mikrofiltracji, zaleca się przefiltrowanie przygotowanego rozpuszczalnika elucyjnego przez filtr dla rozpuszczalników organicznych o wielkości porów mniejszej lub równej 0,45 μm.

4.6.2. Rozpuszczalnik elucyjny B

Metanol (4.4)

4.7. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Wszystkie roztwory wzorcowe po upływie dwóch miesięcy muszą być przygotowywane na świeżo.

4.7.1. Roztwór referencyjny C

Z dokładnością do 0,1 mg odważyć 25 mg soli amonowej kwasu lukrecjowego (4.2) w 100 ml kolbie pomiarowej. Dodać trochę 50 % vol. etanolu (4.5) i rozpuścić sól amonową kwasu lukrecjowego. Po jej rozpuszczeniu dopełnić do znaku przez dodanie 50 % vol. etanolu (4.5).

▼M1

Przefiltrować przez filtr dla rozpuszczalników organicznych.

4.7.2. Roztwory wzorcowe stosowane do sprawdzania liniowości reakcji oprzyrządowania.

Roztwór podstawowy (A)1,0 g/l przygotowuje się przez odważenie z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg soli amonowej kwasu lukrecjowego w 100 ml kolbie pomiarowej. Dodać trochę 50 % vol. etanolu (4.5) i rozpuścić sól amonową kwasu lukrecjowego. Po jej rozpuszczeniu dopełnić do znaku przez dodanie 50 % vol. etanolu (4.5).

Co najmniej cztery inne roztwory odpowiadające 0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 g/l soli amonowej kwasu lukrecjowego przygotowuje się przez pipetowanie odpowiednio 5 ml, 10 ml, 25 ml i 50 ml roztworu podstawowego 1,0 g/l, w oddzielnych 100 ml kolbach pomiarowych. Następnie należy dopełnić do znaku przez dodanie 50 % vol. etanolu (4.5) i dokładnie wymieszać..

Wszystkie roztwory należy przefiltrować przez filtr dla rozpuszczalników organicznych.

5. **Aparatura i wyposażenie**

5.1. System rozdzielenia

5.1.1. Wysokosprawnościowy chromatograf cieczowy.

5.1.2. System pompowania umożliwiający z wielką dokładnością uzyskanie i utrzymanie stałego lub zaprogramowanego natężenia przepływu.

5.1.3. Spektrofotometryczny system wykrywania promieniowania nadfioletowego (UV): ustawienie na 254 nm.

5.1.4. System odgazowywania rozpuszczalnika.

5.2. Integrator lub rejestrator obliczeniowy, kompatybilny z pozostałymi elementami systemu.

5.3. Kolumna (przykład):

Materiał: stal nierdzewna lub szkło

Średnica wewnętrzna: 4–5 mm

Długość: 100–250 mm

Faza stacjonarna: krzemionka usieciowana z (najlepiej sferyczną) oktadecylową grupą funkcyjną (C18), maksymalny rozmiar cząstek: 5 μm.

5.4. Wyposażenie laboratoryjne

5.4.1. Waga analityczna o dokładności do 0,1 mg.

5.4.2. Pomiarowe szkło laboratoryjne klasy A.

5.4.3. Układ filtracji mikromembranowej dla małych objętości.

6. **Warunki chromatografii**

6.1. Charakterystyka elucji (wymywania): (przykład)

— natężenie przepływu: 1 ml/minuta,

— rozpuszczalnik A = 30 %,

— rozpuszczalnik B = 70 %.

6.2. Wykrywanie:

— UV = 254 nm

7. **Procedura**

7.1. Przygotowanie próbki alkoholu

Przefiltrować, jeśli konieczne, przez filtr dla organicznych rozpuszczalników (średnica pora: 0,45 μm.).

7.2. Oznaczanie

Po ustabilizowaniu warunków dla chromatografii,

— wstrzyknąć 20 μl roztworu referencyjnego C (4.7.1),

▼M1

— wstrzyknąć 20 µl roztworu próbki,

— porównać oba chromatogramy. Zidentyfikować piki kwasu lukrecjowego na podstawie ich czasów retencji. Przeprowadzić pomiary ich obszarów (lub wysokości) i obliczyć stężenie w g/l z dokładnością do dwóch liczb dziesiętnych, stosując następujące równanie:

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

Gdzie:

c oznacza stężenie (w gramach na litr) kwasu lukrecjowego w analizowanym napoju alkoholowym

C oznacza stężenie (w gramach na litr) soli amonowej kwasu lukrecjowego w roztworze referencyjnym

h oznacza obszar (lub wysokość) piku kwasu lukrecjowego w analizowanym napoju alkoholowym

H oznacza obszar (lub wysokość) piku kwasu lukrecjowego w roztworze referencyjnym

P oznacza stopień czystości referencyjnej soli amonowej kwasu lukrecjowego (w %)

823 oznacza masę jednej gramocząsteczki kwasu lukrecjowego

840 oznacza masę jednej gramocząsteczki soli amonowej kwasu lukrecjowego

8. **Charakterystyka wyników stosowanej metody (dokładność)**

Wyniki statystyczne badania międzylaboratoryjnego:

poniższa tabela przedstawia wartości dla kwasu lukrecjowego.

Poniższe dane zostały uzyskane z badania wyników międzynarodowej metody przeprowadzonego według ustalonych procedur międzynarodowych.

Rok badania międzylaboratoryjnego	1 998
Liczba laboratoriów	16
Liczba próbek	5
Analit	kwas lukrecjowy

Próbki	A	B	C	D	E
Liczba laboratoriów pozostała po eliminacji wartości odstających	13	14	15	16	16
Liczba wartości odstających (laboratoriów)	3	2	1	–	–
Liczba przyjętych wyników	26	28	30	32	32
Średnia wartość g/l	0,046	0,092 (*)0,099	0,089	0,249	0,493
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Granica powtarzalności (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Granica odtwarzalności (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

▼**M1**

Rodzaje próbek:

A anyżówka (pastis), ślepe duplikaty

B anyżówka (pastis), rozdzielone poziomy

C anyżowka (pastis), ślepe duplikaty

D anyżowka (pastis), ślepe duplikaty

E anyżowka (pastis), ślepe duplikaty

▼M1

VII. **CHALKONY. METODA WYSOKOSPRAWNOŚCIOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ DLA SPRAWDZANIA OBECNOŚCI CHALKONÓW W ANYŻÓWCE (PASTIS)**

1. **Zakres**

Metoda ta jest przydatna do oznaczenia obecności lub braku chalkonów w napojach alkoholowych aromatyzowanych anyżkiem. Chalkony są naturalnymi barwnikami rodziny flawonoidów obecnymi w korzeniu lukrecji (*Glycyrrhiza glabra*).

Aby otrzymać nazwę „pastis", napój alkoholowy aromatyzowany anyżkiem musi zawierać chalkony (rozporządzenie (EWG) nr 1576/89).

2. **Odniesienia normatywne**

ISO 3696: 1987 Woda do zastosowań w laboratorium analitycznym – specyfikacje i metody testów (Water for analytical laboratory use – Specifications and test methods).

3. **Zasada**

Przygotowuje się referencyjny roztwór ekstraktu korzenia lukrecji. Obecność lub brak chalkonów ustala się za pomocą wysokosprawnościowej chromatografii cieczowej (HPLC) z wykrywaniem promieni nadfioletowych (UV).

4. **Odczynniki i materiały**

Do analizy należy używać wyłącznie odczynników klasy HPLC, etanolu 96 % vol i wody klasy 3 według definicji ISO 3696.

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

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

4.3. Substancja referencyjna: *Glycyrrhiza glabra*: lukrecja, „słodki korzeń"

Grubo zmielone korzenie lukrecji (*Glycyrrhiza glabra*). Przeciętne rozmiary sztywnych cząstek (ziaren): długość: 10–15 mm, grubość: 1–3 mm.

4.4. Octan sodu, CH_3COONa, (CAS 127-09-3)

4.5. Kwas octowy lodowaty, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.6. Przygotowanie roztworów

4.6.1. Etanol 50 % obj.

Dla 1 000 ml w temp. 20 °C:

— 96 % vol. etanol (4.1): 521 ml,

— Woda (2.0): 511 ml.

4.6.2. Rozpuszczalnik A: acetonitryl

Acetonitryl (4.2) o czystości analitycznej HPLC.

Odgazowanie

4.6.3. Rozpuszczalnik B: 0,1 M roztwór buforowy octanu sodu, pH 4,66.

Odważyć 8,203 g octanu sodu (4.4), dodać 6,005 g lodowatego kwasu octowego (4.5) i uzupełnić do 1 000 ml wodą (2) w kolbie pomiarowej.

5. **Przygotowanie ekstraktu referencyjnego z korzenia lukrecji *Glycyrrhiza glabra* (4.3)**

5.1. Odważyć 10 g zmielonego korzenia lukrecji (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) i umieścić w kulistej kolbie destylacyjnej

— dodać 100 ml 50 % vol. etanolu (4.6.1),

— gotować przez godzinę pod chłodnicą zwrotną,

— filtrować,

— odstawić filtrat do późniejszego wykorzystania.

5.2. Odzyskać z filtra ekstrakt lukrecji

▼M1

— umieścić w kulistej kolbie destylacyjnej,

— dodać 100 ml 50 % vol. etanolu (4.6.1),

— gotować przez godzinę pod chłodnicą zwrotną,

— flitować. Odstawić filtrat do późniejszego wykorzystania.

5.3. Ekstrakcja z korzenia lukrecji musi być przeprowadzona kolejno trzy razy.

5.4. Połączyć trzy filtraty.

5.5. Odparować fazę rozpuszczalnika (5.4) na wyparce rotacyjnej.

5.6. Rozpuścić szczątkowy ekstrakt (5.5), dodając 100 ml 50 % vol. etanolu (4.6.1).

6. **Aparatura i wyposażenie**

6.1. System rozdzielenia.

6.1.1. Wysokosprawnościowy chromatograf cieczowy.

6.1.2. System pompowania umożliwiający z wielką dokładnością uzyskanie i utrzymanie stałego lub zaprogramowanego natężenia przepływu.

6.1.3. Spektrofotometryczny system wykrywania promieniowania nadfioletowego (UV)/widzialnego: możliwość ustawienia na 254 nm i 370 nm.

6.1.4. System odgazowywania rozpuszczalnika:

6.1.5. Piec kolumny z możliwością ustawienia na temperaturę 40 ± 0,1 °C.

6.2. Integrator lub rejestrator obliczeniowy, kompatybilny z pozostałymi elementami systemu

6.3. Kolumna

Materiał: stal nierdzewna lub szkło

Średnica wewnętrzna: 4–5 mm

Faza stacjonarna: krzemionka usieciowana z (najlepiej sferyczną) oktadecylową grupą funkcyjną (C18), maksymalny rozmiar cząstek: 5 μm.

6.4. Zwykłe wyposażenie laboratoryjne, w tym:

6.4.1. waga analityczna o dokładności do ± 0,1 mg;

6.4.2. Aparat destylacyjny z chłodnicą zwrotną, zawierający np.:

— 250 ml kulistą kolbę ze znormalizowanym złączem szlifowym,

— chłodnica zwrotna o długości 30 cm, oraz

— źródło ciepła (poprzez odpowiednie przygotowania należy unikać jakichkolwiek reakcji pyrogenicznych obejmujących substancję ekstrahowaną).

6.4.3. Obrotowy aparat wyparny.

6.4.4. Układ filtracyjny (np. lejek Buchnera).

6.5. Warunki chromatografii (przykład).

6.5.1. Charakterystyka elucji (wymywania) rozpuszczalników A (4.6.2) i B (4.6.3):

— w ciągu 15 minut przesunięcie z 20/80 (v/v) do 50/50 (v/v) gradienta,

— w ciągu 5 minut przesunięcie z 50/50 (v/v) do 75/25 (v/v) gradienta,

— w ciągu 5 minut jednakowa moc przy 75/25 (v/v),

— stabilizacja kolumny pomiędzy wstrzyknięciami,

— przez 5 minut jednakowa moc przy 20/80 (v/v).

6.5.2. Natężenie przepływu: 1 ml/min.

▼M1

6.5.3. Ustawienia detektora UV (promieniowania nadfioletowego):

detektor musi być ustawiony na 370 nm w celu wykrycia obecności chalkonów, a następnie na 254 nm dla wykrycia kwasu lukrecjowego.

Uwaga: zmiana długości fali (z 370 nm na 254 nm) musi być przeprowadzona 30 sekund przed początkiem piku elucji kwasu lukrecjowego.

7. **Procedura**

7.1. Przygotowanie próbki alkoholu

Przefiltrować przez filtr dla rozpuszczalników organicznych (średnica pora: 0,45 μm).

7.2. Przygotowanie resztkowego ekstraktu lukrecji (5.6)

Przed analizą rozcieńczyć w stosunku 1: 10 50 % vol. etanolem (4.6.1).

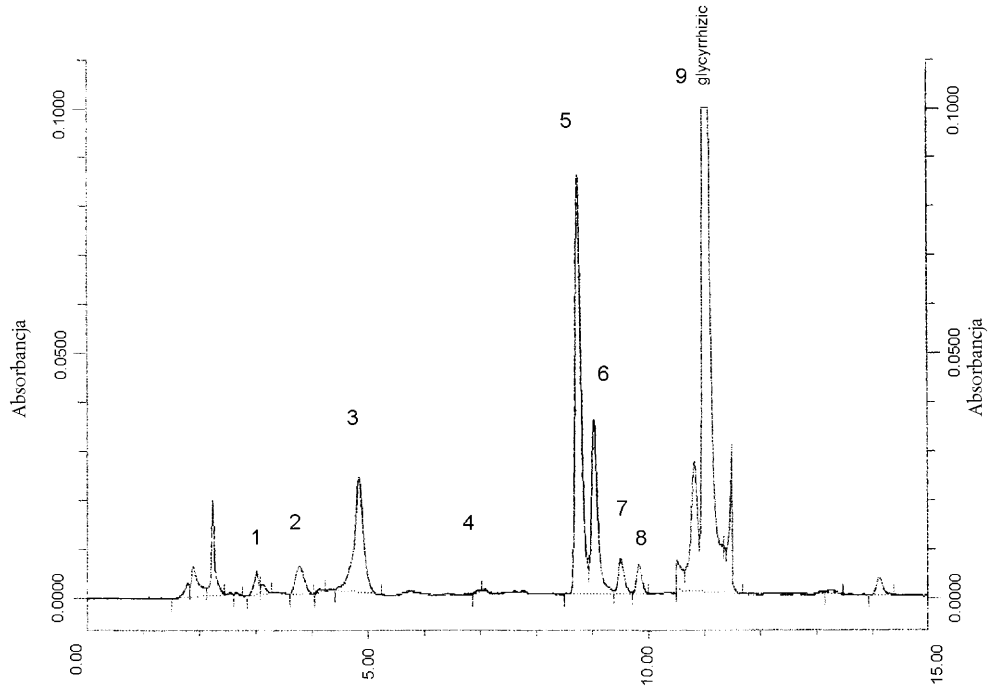
7.3. Oznaczanie

7.3.1. Wstrzyknąć 20 μl przygotowanego ekstraktu lukrecji (7.2). Przeprowadzić analizę przy zastosowaniu warunków chromatografii przedstawionych powyżej (6.5).

7.3.2. Wstrzyknąć 20 μl próbki (7.1) (próbka napoju alkoholowego aromatyzowanego anyżem). Przeprowadzić analizę, stosując przedstawione powyżej (6.5). warunki chromatografii.

7.3.3. Porównać oba chromatografy, między którymi musi być duże podobieństwo w strefie wyjścia chalkonu (podczas wykrywania przy 370 nm w warunkach analizy jak przedstawiono powyżej) (patrz rys. 1).

8. **Chromatogram charakterystyki anyżówki (pastis)**



▼M1

9. **Charakterystyka wyników metody (dokładność)**

Wyniki badań:

poniższa tabela podaje wyniki dotyczące rozpoznania obecności lub nieobecności chalkonów w „pastis" i napojach alkoholowych aromatyzowanych anyżem.

Poniższe dane zostały uzyskane z badania wyników międzynarodowej metody przeprowadzonego według ustalonych procedur międzynarodowych.

Rok badania międzylaboratoryjnego	1 998
Liczba laboratoriów	14
Liczba próbek	11
Analit	chalkony

Próbki	A	B	C	D	E	F
Liczba laboratoriów pozostała po eliminacji wartości odstających	14	14	14	14	14	13
Liczba wartości odstających (laboratoriów)	–	–	–	–	–	1 (*)
Liczba przyjętych wyników	28	14	14	28	28	26
Liczba wyników na obecność chalkonów	28	14	14	0	28	0
Liczba wyników na nieobecność chalkonów	0	0	0	28	0	26
Poprawne wyniki (%)	100	100	100	100	100	100

(*) niezgodne wyniki dwóch duplikatów uznaje się za spowodowane błędem pobierania próbek

Próbki	G	H	I	J	K
Liczba laboratoriów pozostała po eliminacji wartości odstających	14	14	14	14	14
Liczba wartości odstających (laboratoriów)	–	–	–	–	–
Liczba przyjętych wyników	28	14	14	28	28
Liczba wyników na obecność chalkonów	0	0	0	0	0
Liczba wyników na nieobecność chalkonów	28	14	14	28	28
Poprawne wyniki (%)	100	100	100	100	100

Rodzaje próbek:

A pastis, ślepe duplikaty

B pastis, próbka pojedyncza

C pastis, próbka pojedyncza

D „pastis" (niezawierający chalkonów), ślepe próbki

E „pastis" (niezawierający chalkonów), ślepe próbki

F likier aromatyzowany anyżem (niezawierający chalkonów), ślepe próbki

G likier aromatyzowany anyżem (niezawierający chalkonów), ślepe próbki

H ouzo (niezawierający chalkonów), pojedyncza próbka

I ouzo (niezawierające chalkonów), pojedyncza próbka

J anyż (niezawierający chalkonów), ślepe próbki

K „pastis" (niezawierający chalkonów), ślepe próbki

▼M1

IX. ŻÓŁTKO JAJA. OZNACZANIE STĘŻENIA ŻÓŁTKA JAJA W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH – METODA FOTOMETRYCZNA

1. **Zakres**

Metoda ta jest stosowana do oznaczania stężenia żółtka jaja w zakresie od 40 do 250 g/l w likierze jajecznym i likierze z dodatkiem jaj.

2. **Odniesienia normatywne**

ISO 3696: 1987 Woda do zastosowań w laboratorium analitycznym – specyfikacje i metody testów 1897 (Water for analytical laboratory use – Specifications and test methods.)

3. **Zasada**

Rozpuszczalne w etanolu, obecne w żółtku jaja związki fosforu zostają ekstrahowane i oznaczone fotometrycznie jako związek kompleksowy molibdenianu fosforu.

4. **Odczynniki i materiały**

4.1. Woda dwukrotnie destylowana

4.2. Ziemia okrzemkowa

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

4.4. 15 % roztwór octanu magnezu (CAS 16674-78-5)

4.5. 10 % kwas siarkowy (CAS 7664-93-9)

4.6. 1 N kwasu siarkowego.

4.7. Roztwór 0,16 g/l diwodorofosforanu potasu (CAS 778-77-0), KH2PO4

4.8. Odczynnik do oznaczania fosforanu:

rozpuścić 20 g heptamolibdenianu amonu (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ w 400 ml wody w temp. 50 °C;

w drugim naczyniu rozpuścić 1 g wanadianu amonu (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3 w 300 ml gorącej wody, dopuścić do ostygnięcia, a następnie dodać 140 ml stężonego kwasu azotowego (CAS 7697-37-2). Połączyć schłodzone roztwory w 1 000 ml kolbie pomiarowej i uzupełnić do znaku 1 000 ml.

5. **Aparatura i wyposażenie**

5.1. 100 ml stożkowa kolba

5.2. Kąpiel ultradźwiękowa (lub mieszadło indukcyjne)

5.3. 100 ml kolba pomiarowa

5.4. 20 °C kąpiel wodna

5.5. Filtr (Whatman nr 4 lub ekwiwalent)

5.6. Tygiel porcelanowy (lub platynowy)

5.7. Kąpiel wodna z wrzącej wody

5.8. Płyta grzejna

5.9. Piec muflowy

5.10. 50 ml kolba pomiarowa

5.11. 20 ml kolba pomiarowa

5.12. Spektrofotometr ustawiony na 420 nm

5.13. 1 cm kuweta.

6. **Próbki**

Próbki są przechowywane przed analizą w temperaturze pokojowej.

▼M1

7. **Procedura**

7.1. Przygotowanie próbki

7.1.1. Odważyć 10 g próbki do 100 ml kolby stożkowej (5.1).

7.1.2. Dodawać stopniowo w małych porcjach 70 ml etanolu (4.3), z wirowaniem przy każdym dodaniu, i umieścić w kąpieli ultradźwiękowej (5.2) na 15 minut (lub mieszać mieszaninę mieszadłem magnetycznym (5.2) przez 10 minut w temperaturze pokojowej).

7.1.3. Przenieść zawartość kolb do 100 ml kolby pomiarowej (5.3) z popłuczynami etanolu (4.3). Nastawić do znaku kalibracji z etanolem (4.3) i umieścić kolby w 20 °C kąpieli wodnej (5.4). Wyregulować do znaku kalibracji przy 20 °C.

7.1.4. Dodać niewielką ilość ziemi okrzemkowej (4.2) i filtrować (5.5), odrzucając pierwsze 20 ml.

7.1.5. Przenieść 25 ml filtratu do porcelanowego (lub platynowego) tygla (5.6). Następnie filtrat musi być zagęszczony poprzez delikatne odparowywanie w kąpieli we wrzącej wodzie (5.7), z dodatkiem 5 ml 15 % roztworu octanu magnezu (4.4).

7.1.6. Umieścić tygle na płycie grzejnej (5.8) i podgrzewać aż do wysuszenia.

7.1.7. Spopielić pozostałość przez podgrzanie do żarzenia w 600 °C w piecu muflowym (5.9) aż do uzyskania białego popiołu. Proces ten ma trwać przez minimum półtorej godziny, ale można również zostawić przez noc.

7.1.8. Rozpuścić popiół w 10 ml 10 % kwasu siarkowego (4.5) i przenieść wraz z popłuczynami wody destylowanej (4.1) do 50 ml kolby pomiarowej (5.10), dopełnić do znaku wodą destylowaną w temperaturze pokojowej. (4.1). 5 ml alikwot (jednakowa objętość roztworu rozdzielana do probówek) tego rozpuszczonego popiołu ma być używany do przygotowania próbnego roztworu do fotometrycznego oznaczania fosforanu.

7.2. Fotometryczne oznaczanie (analiza) fosforanu.

7.2.1. Roztwór porównawczy

7.2.1.1. Umieścić 10 ml 10 % kwasu siarkowego (4.5) w 50 ml kolbie pomiarowej (5.10) i uzupełnić do znaku wodą destylowaną (4.1).

7.2.1.2. Dodać do 5 ml alikwotu tego roztworu (7.2.1.1), zawartego w 20 ml kolbie pomiarowej (5.11), 1 ml jednonormalnego roztworu kwasu siarkowego (1 N) (4.6) i 2 ml odczynnika do oznaczania fosforanu (4.8) i dopełnić wodą destylowaną do 20 ml (4.1).

7.2.1.3. Zakorkować luźno zatyczką, potrząsnąć i grzać w kąpieli z wrzącej wody (5.7) przez 10 minut, następnie schłodzić w 20 °C kąpieli wodnej (5.4) przez 20 minut.

7.2.1.4. Wypełnić 1 cm kuwetę (5.13) tym porównawczym roztworem.

7.2.2. Roztwór próbny

7.2.2.1. Dodać do 5 ml alikwotu roztworu popiołu (7.2.1.1), zawartego w 20 ml kolbie pomiarowej (5.11), 1 ml jednonormalnego roztworu kwasu siarkowego (1 N) (4.6) i 2 ml odczynnika dla oznaczania fosforanu (4.8) i dopełnić wodą destylowaną do 20 ml (4.1).

7.2.2.2. Zatkać luźno zatyczką, wstrząsnąć i grzać w kąpieli z wrzącej wody (5.7) przez 10 minut, następnie schłodzić w 20 °C kąpieli wodnej (5.4) przez 20 minut.

7.2.2.3. Wytworzony w wyniku powyższych czynności żółty roztwór należy niezwłocznie poddać analizie spektrofotometrycznej (5.12) w 1 cm kuwecie (5.13) przy 420 nm, w stosunku do roztworu porównawczego (7.2.1.4).

7.2.3. Krzywa wzorcowania

7.2.3.1. Dla uzyskania krzywej wzorcowania dodać 2 ml alikwotów odczynnika fosforanu (4.8) do 20 ml kolb pomiarowych (5.11), z których każda zawiera odpowiednio 1ml jednonormalnego kwasu siarkowego

▼M1

(4.6) i 0, 2, 4, 6, 8 i 10 ml roztworu diwodorofosforanu potasu (4.7) i uzupełnić woda destylowaną do znaku 20 ml (4.1).

7.2.3.2. Zatkać luźno zatyczką, wstrząsnąć i grzać w kąpieli z wrzącej wody (5.7) przez 10 minut, następnie schłodzić w 20 °C kąpieli wodnej (5.4) przez 20 minut i poddać analizie spektrofotometrycznej (5.12) w 1 cm kuwecie (5.13) przy 420 nm, w stosunku do roztworu porównawczego (7.2.1.4).

7.2.3.3. Konstrukcja krzywej wzorcowania

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

8. **Przedstawienie wyników**

Zawartość żółtka jaja w g/l oblicza się z następującego wzoru:

$$\text{g/l żółtka jaja} = \text{mg}P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{gęstość (density)}}{E/40}$$

gdzie:

110	oznacza przelicznik dla całkowitego P_2O_5 w g w 100 g żółtka jaja
mg P_2O_5	oznacza wartość ustaloną z krzywej wzorcowania
gęstość (density)	oznacza masę właściwą na jednostkę objętości (g/ml) likieru na bazie jaj w temp. 20 °C
E	oznacza wagę likieru na bazie jaj w g
40	oznacza współczynnik rozcieńczenia dla 5 ml alikwotu roztworu popiołu.

9. **Charakterystyka wyników metody (dokładność)**

Statystyczne wyniki badań międzylaboratoryjnych:

poniższa tabela podaje wartości dla żółtka jaja.

Poniższe dane zostały uzyskane z badania wyników międzynarodowej metody przeprowadzonego według ustalonych międzynarodowych procedur.

Rok badania międzylaboratoryjnego	1 998
Liczba laboratoriów	24
Liczba próbek	5
Analiz:	żółtko jaja

Próbki	A	B	C	D	E
Liczba laboratoriów pozostała po eliminacji wartości odstających	19	20	22	20	22
Liczba wartości odstających (laboratoriów)	3	4	2	4	2
Liczba przyjętych wyników	38	40	44	40	44
Wartość średnia	147,3	241,1	227,4	51,9* 72,8*	191,1
Odchylenie standardowe powtarzalności (Sr) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Względne odchylenie standardowe powtarzalności (RSDr) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Granica powtarzalności (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Odchylenie standardowe odtwarzalności (SR) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87

▼**M1**

Próbki	A	B	C	D	E
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności (RSDR) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Granica odtwarzalności (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Rodzaje próbek

A Advocaat, ślepe duplikaty

B Advocaat, ślepe duplikaty

C Advocaat, ślepe duplikaty

D Advocaat (rozcieńczony), rozdzielone poziomy*

E Advocaat, ślepe duplikaty