Acest document reprezintă un instrument de documentare, iar instituțiile nu își asumă responsabilitatea pentru conținutul său.

►**B**

REGULAMENTUL (CE) NR. 2870/2000 AL COMISIEI

din 19 decembrie 2000

de stabilire a metodelor comunitare de referință pentru analiza băuturilor spirtoase

(JO L 333, 29.12.2000, p. 20)

Astfel cum a fost modificat prin:

		Jurnalul Oficial		
		NR.	Pagina	Data
►**M1**	Regulamentul (CE) nr. 2091/2002 al Comisiei din 26 noiembrie 2002	L 322	11	27.11.2002

▼B

REGULAMENTUL (CE) NR. 2870/2000 AL COMISIEI

din 19 decembrie 2000

de stabilire a metodelor comunitare de referință pentru analiza băuturilor spirtoase

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene;

având în vedere Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 al Consiliului din 29 mai 1989 de stabilire a normelor generale privind definirea, descrierea și prezentarea băuturilor spirtoase ([1]), astfel cum a fost modificat prin Actul de aderare a Austriei, Finlandei și Suediei, în special articolul 4 alineatul (8);

întrucât:

(1) Articolul 4 alineatul (8) din Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 prevede adoptarea metodelor de analiză a băuturilor spirtoase. Metodele de referință ar trebui utilizate pentru a asigura conformitatea cu Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 și Regulamentul nr. 1014/90 al Comisiei din 24 aprilie 1990 de stabilire a normelor de aplicare privind definirea, descrierea și prezentarea băuturilor spirtoase ([2]), astfel cum a fost modificat ultima dată prin Regulamentul (CE) nr. 2140/98 ([3]), în cazul unui control oficial sau al unui diferend.

(2) În măsura în care este posibil, ar fi util să se adopte și să se descrie metodele general recunoscute ca metode analitice de referință la nivel comunitar.

(3) Pentru a ține seama de progresele științifice și de diferențele în ceea ce privește echipamentele laboratoarelor oficiale, ar trebui admisă utilizarea metodelor bazate pe alte principii de măsurare decât metodele de referință descrise în anexa la prezentul regulament, de acest lucru fiind responsabil directorul de laborator, atunci când măsurile respective oferă garanții corespunzătoare cu privire la rezultate și, în special, îndeplinesc criteriile stabilite în anexa la Directiva 85/591/CEE a Consiliului din 20 decembrie 1985 privind introducerea metodelor comunitare de prelevare de probe și de analiză a produselor alimentare destinate consumului uman ([4]) și dacă se poate demonstra că variațiile în ceea ce privește precizia, repetabilitatea și reproductibilitatea rezultatelor obținute se află în limitele celor obținute prin utilizarea metodelor de referință descrise în prezentul regulament. În cazul în care este respectată această condiție, ar trebui admisă utilizarea altor metode analitice. Cu toate acestea, este important de menționat că în cazul unui diferend, celelalte metode nu pot înlocui metodele de referință.

(4) Măsurile prevăzute de prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului de aplicare pentru băuturi spirtoase,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Metodele de referință comunitare pentru analiza băuturilor spirtoase prin care să se asigure conformitatea cu Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 și Regulamentul (CEE) 1014/90:

— în cazul unui control oficial sau

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

▼B

— în eventualitatea unui diferend,

sunt cele menționate în anexa la prezentul regulament.

Articolul 2

Fără a aduce atingere articolului 1 prima liniuță, alte metode analitice sunt admise sub responsabilitatea directorului de laborator, cu condiția ca exactitatea și precizia (repetabilitatea și reproductibilitatea) metodelor să fie cel puțin echivalente cu cele ale metodelor analitice de referință prevăzute de anexă.

Articolul 3

Atunci când nu sunt stabilite metode de referință comunitare analitice pentru detectarea și cuantificarea substanțelor conținute într-o anumită băutură spirtoasă, se utilizează următoarele metode:

(a) metode analitice validate pentru proceduri recunoscute la nivel internațional și care îndeplinesc, în special, criteriile stabilite în anexa la Directiva 85/591/CEE;

(b) metode analitice conforme cu standardele recomandate ale Organizației Internaționale pentru Standardizare (ISO);

(c) metode analitice recunoscute de Adunarea Generală a Oficiului Internațional al Viei și Vinului (OIV) și publicate de oficiul respectiv;

(d) în absența unei metode menționate la literele (a), (b) și (c), din motive de exactitate, repetabilitate și reproductibilitate:

— o metodă analitică aprobată de statul membru în cauză;

— acolo unde este cazul, orice altă metodă analitică adecvată.

Articolul 4

În sensul prezentului regulament:

(a) „limită de repetabilitate” reprezintă valoarea mai mică sau egală pentru care se estimează o diferență absolută între două rezultate ale testării, obținute în condiții de repetabilitate (același operator, aceeași aparatură, același laborator și un interval scurt de timp), cu o probabilitate de 95 % (ISO 3534-1);

(b) „limită de reproductibilitate” reprezintă valoarea mai mică sau egală pentru care se estimează o diferență absolută între două rezultate ale testării, obținute în condiții de reproductibilitate (operatori diferiți, aparatură diferită, laborator diferit), cu o probabilitate de 95 % (ISO 3534-1);

(c) „precizie” reprezintă gradul de concordanță dintre rezultatul unui test și valoarea de referință acceptată (ISO 3534-1).

Articolul 5

Prezentul regulament intră în vigoare în a șaptea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Prezentul regulament se aplică de la 1 ianuarie 2001.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și este direct aplicabil în toate statele membre.

▼B

ANEXĂ

DESCRIEREA METODELOR DE REFERINȚĂ ANALITICE

I. Determinarea tăriei alcoolice în volume

Apendicele I: Pregătirea distilatului

Apendicele II: Măsurarea densității distilatului

— Metoda A = picnometrie

— Metoda B = densimetrie electronică

— Metoda C = densimetrie utilizând balanța hidrostatică

II. Determinarea extractului sec total prin gravimetrie

III. Determinarea substanțelor volatile și a metanolului

III.1. Observații generale

III.2. Congeneri volatili: aldehide, alcooluri superioare, acetat de etil și metanol (cromatografie gazoasă)

III.3. Aciditate volatilă (p.m.)

IV. Acid hidrocianic (p.m.)

V. Anetol ►M1 ——————— ◄

VI. Acid glicirizic ►M1 ——————— ◄

VII. Calcone ►M1 ——————— ◄

VIII. Glucide totale (p.m.)

IX. Gălbenuș de ou ►M1 ——————— ◄

▼B

I. DETERMINAREA TĂRIEI ALCOOLICE ÎN VOLUME LA BĂUTURILE SPIRTOASE

Introducere

Metoda de referință include două apendice:

Apendicele I: Pregătirea distilatului

Apendicele II: Măsurarea densității distilatului

1. **Domeniu**

Metoda este adecvată pentru determinarea tăriei alcoolice reale în volume la băuturile spirtoase.

2. **Referințe normative**

ISO 3696:1987:Apă pentru uzul laboratoarelor de analiză – specificații și metode de testare

3. **Termeni și definiții**

3.1. *Temperatura de referință*:

Temperatura de referință pentru determinarea tăriei alcoolice în volume, a densității și a densității specifice la băuturile spirtoase este de 20 °C.

Nota 1: termenul „la t °C” este rezervat pentru toate determinările (a densității sau tăriei alcoolice în volume) exprimate la o temperatură diferită de temperatura de referință de 20 °C.

3.2. *Densitate*:

Densitatea reprezintă masa per unitate de volum *in vacuo* la băuturile spirtoase la 20 °C. Se exprimă în kg per metri cubi, iar simbolul său este $\rho_{20\ °C}$ sau ρ_{20}.

3.3. *Densitatea specifică*:

Densitatea specifică reprezintă raportul, exprimat ca număr zecimal, dintre densitatea unei băuturi spirtoase la 20 °C și densitatea apei la aceeași temperatură. Are simbolul $d_{20\ °C/20\ °C}$ sau $d_{20/20}$, sau numai d, atunci când nu există posibilitatea de a se crea confuzie. Caracteristica măsurată trebuie specificată pe certificatul de testare, fiind utilizate numai simbolurile definite mai sus.

Nota 2: Densitatea specifică poate fi obținută pe baza densității ρ_{20} la 20 °C.

$\rho_{20} = 998,203 \times d_{20/20}$ sau $d_{20/20} = \rho_{20}/998,203$ unde 998,203 reprezintă densitatea apei la 20 °C.

3.4. *Tăria alcoolică reală în volume*:

Tăria alcoolică reală în volume la băuturile spirtoase este egală cu numărul de litri de alcool etilic conținuți în 100 litri de amestec apă-alcool cu aceeași densitate ca și alcoolul sau băutura spirtoasă după distilare. Valorile de referință pentru tăria alcoolică în volume (% vol) la 20 °C în raport cu densitatea la 20 °C pentru diferite amestecuri apă-alcool care sunt utilizare sunt cele din tabelul internațional adoptat de Organizația Internațională de Metrologie Legală în Recomandarea nr. 22.

Ecuația generală care stabilește legătura între tăria alcoolică în volume și densitatea unui amestec apă-alcool la o anumită temperatură este dată la pagina 40 din capitolul 3 „Tăria alcoolică în volume” din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 al Comisiei (JO L 272, 3.10.1990, p. 1) sau în manualul metodelor de analiză al OIV (1994) (p. 17).

Nota 3: pentru lichioruri și „lichioruri-cremă” al Comisiei căror volum exact este foarte greu de măsurat, trebuie cântărită proba iar tăria alcoolică se calculează întâi pe baza masei.

Formula de conversie:

▼B

$$\text{tărie alcoolică în volume} = \frac{\text{TAM (\% masă)} \times P_{20}\text{ (probă)}}{P_{20}\text{ (alcool)}}$$

unde TAM = tărie alcoolică în masă,

ρ_{20} (alcool) = 789,24 kg/m^3

4. **Principiu**

În urma distilării, tăria alcoolică în volume a distilatului se determină prin picnometrie, densimetrie electronică sau densimetrie, cu utilizarea unei balanțe hidrostatice.

▼B

APENDICELE I: PREGĂTIREA DISTILATULUI

1. **Domeniu**

Metoda este adecvată pentru pregătirea distilatelor utilizate la determinarea tăriei alcoolice în volume la băuturile spirtoase.

2. **Principiu**

Băuturile spirtoase sunt distilate pentru a separa alcoolul etilic de alte componente volatile de materia extractivă (substanțe care nu se distilează).

3. **Reactivi și materiale**

3.1. Granule împotriva împroșcării.

3.2. Emulsie antispumantă concentrată (pentru lichiorurile-cremă).

4. **Aparatură și echipamente**

Aparatura de laborator obișnuită și, în special, următoarele:

4.1. Baie de apă care poate fi menținută între 10 °C și 15 °C.

Baie de apă care poate fi menținută la 20 °C (± 0,2 °C).

4.2. Baloane volumetrice clasa A, 100 ml și 200 ml, care au fost certificate la 0,1 % și respectiv 0,15 %.

4.3. Aparat de distilare:

4.3.1. Cerințe generale

Aparatul de distilare trebuie să îndeplinească următoarele cerințe:

— numărul de îmbinări nu trebuie să depășească strictul minim necesar pentru a asigura un sistem etanș;

— să includă un dispozitiv care să prevină amorsa (antrenarea lichidului în fierbere de vapor) și să normalizeze ritmul de distilare a vaporilor bogați în alcool;

— condensare rapidă și completă a vaporilor de alcool;

— colectarea primelor fracții de distilare într-un mediu apos.

Sursa de căldură trebuie utilizată cu un difuzor de căldură adecvat pentru a preveni orice reacție pirogenă care să implice materia extractivă.

4.3.2. Figura 1 exemplifică un aparat de distilare adecvat care include următoarele părți:

— balon cu fund rotund, de 1 litru, cu o îmbinare din sticlă mată;

— coloană de rectificare cu înălțimea minimă de 20 cm (de exemplu o coloană tip „Vigreux”);

— conector cu cot cu un condensator cu margine dreaptă cu lungimea de 10 cm (condensator tip West) fixat vertical;

— spirală de răcire cu lungimea de 40 cm;

— tub de extragere, care transportă distilatul pe fundul unui balon gradat de colectare care conține o cantitate mică de apă.

Notă: aparatul descris mai sus este adecvat în cazul unei probe de minim 200 ml. Cu toate acestea, se poate distila o probă mai mică (100 ml) cu ajutorul unui balon de distilare mai mic, cu condiția să fie dotat cu un cap barbotor sau un alt instrument pentru a preveni antrenarea.

5. **Depozitarea probelor de testare**

Înainte de analiză, probele sunt depozitate la temperatura camerei.

6. **Mod de lucru**

Observații preliminare:

▼B

Distilarea poate fi făcută pe baza procedurii publicată de IUPAC (1968).

6.1. Verificarea aparatului de distilare.

Aparatura utilizată trebui să poată permite următoarele:

Distilarea a 200 ml soluție apă-alcool cu o concentrație cunoscută aproape de 50 % vol nu trebuie să cauzeze o pierdere de alcool mai mare de 0,1 % vol.

6.2. Băuturile spirtoase cu o tărie alcoolică sub 50 % vol.

Se măsoară 200 ml băutură spirtoasă într-un balon volumetric.

Se notează temperatura acestui lichid sau se menține o temperatură standard (20 °C).

Se toarnă proba în balonul cu fund rotund din aparatura de distilare și se limpezește balonul volumetric cu trei porțiuni, fiecare de aproximativ 20 ml apă distilată. Se adaugă fiecare porțiune de apă de limpezire la conținutul balonului de distilare.

Notă: Această diluție de 60 ml este suficientă pentru băuturile spirtoase care conțin mai puțin de 250 g extract sec la litru. În rest, pentru a preveni piroliza, volumul de apă de limpezire trebuie să fie de cel puțin 70 ml când concentrație extrasului sec este de 300 g/l, 85 ml pentru 400 g/l extract sec și 100 ml pentru 500 g/l extract sec (anumite lichioruri sau creme de fructe). Se ajustează aceste volume proporțional cu diferitele volume ale probelor.

Se adaugă câteva granule antiîmproșcare (3.1) (și emulsie antispumantă în cazul lichiorurilor -cremă).

Se toarnă 20 ml apă distilată în balonul volumetric original de 200 ml care va fi utilizat pentru a păstra distilatul. Acest balon trebuie apoi plasat într-o baie de apă rece (4.1) (între 10 și 15 °C pentru băuturile spirtoase cu aromă de anason).

Se distilează, evitându-se antrenarea și carbonizarea, agitând uneori conținutul balonului, până când nivelul distilatului este cu câțiva milimetri sub marcajul de calibrare a balonului volumetric.

Atunci când temperatura distilatului a fost coborâtă la ± 0,5 °C față de temperatura inițială a lichidului, se completează cu apă distilată până la marcaj și se amestecă bine.

Distilatul este folosit pentru a determina tăria alcoolică în volume (apendicele II).

6.3. Băuturi spirtoase cu tărie alcoolică peste 50 % vol.

Se măsoară 100 ml băutură spirtoasă într-un balon volumetric de 100 ml și se toarnă în balonul cu fund rotund din aparatura de distilare.

Se limpezește balonul volumetric de câteva ori cu apă distilată și se adaugă apa respectivă la conținutul balonului de distilare cu fund rotund. Se utilizează suficientă apă pentru a aduce conținutul balonului până la aproximativ 230 ml.

Se toarnă 20 ml apă distilată într-un balon volumetric de 200 ml care va fi utilizat pentru a păstra distilatul. Acest balon trebuie plasat într-o baie de apă rece (4.1) (între 10 și 15 °C pentru băuturile spirtoase cu aromă de anason).

Se distilează, agitându-se uneori conținutul balonului, până când nivelul distilatului este cu câțiva milimetri sub marcajul de calibrare a balonului volumetric de 200 ml.

Atunci când temperatura distilatului a fost coborâtă la ± 0,5 °C față de temperatura inițială a lichidului, se completează cu apă distilată până la marcaj și se amestecă bine.

Distilatul este folosit pentru a determina tăria alcoolică în volume (apendicele II).

Notă: tăria alcoolică în volume a băuturii spirtoase este dublul tăriei alcoolice a distilatului.

▼B

APENDICELE II: MĂSURAREA DENSITĂȚII DISTILATULUI

METODA A: DETERMINAREA TĂRIEI ALCOOLICE REALE ÎN VOLUME LA BĂUTURILOR SPIRTOASE – MĂSURAREA PRIN PICNOMETRIE

A.1. **Principiu**

Tăria alcoolică în volume este obținută din densitatea distilatului măsurată prin picnometrie.

A.2. **Reactivi și materiale**

Pe durata analizei, dacă nu se specifică altfel, se utilizează numai reactivi cu grad analitic recunoscut și apă de cel puțin gradul 3 conform definiției ISO 3696:1987.

A.2.1. Soluție de clorură de sodiu (2 % m/v)

Pentru a pregăti 1 litru, se cântăresc 20 g clorură de sodiu și se dizolvă până la un litru folosind apă.

A.3. **Aparatură și echipamente**

Aparatura de laborator obișnuită și, în special, următoarele:

A.3.1. Balanță analitică permițând cântărirea a 0.1 mg.

A.3.2. Termometru, cu îmbinare cu sticlă rodată, etalonat în zecimi de grad de la 10 la 30 °C. Acest termometru trebuie certificat sau testat pe baza unui termometru certificat.

A.3.3. Picnometru din sticlă pyrex cu o capacitate de aproximativ 100 ml dotat cu un termometru detașabil din sticlă mată (A.3.2). Picnometrul are un tub lateral cu o lungime de 25 mm și un diametru intern de (maximum) 1 mm care se încheie cu o îmbinare șlefuită conică. Pot fi utilizate și alte picnometre conform descrierii ISO 3507, de exemplu 50 ml, acolo unde este cazul.

A.3.4. O sticlă utilizată ca tară cu același volum extern (maxim 1 ml) ca și picnometrul și cu masa egală cu masa picnometrului umplut cu un lichid cu densitatea 1.01 (soluție de clorură de sodiu A.2.1).

A.3.5. Manta izolată termic se mulează exact pe corpul picnometrului.

Nota 1: metoda pentru determinarea densității băuturilor alcoolice *in vacuo* necesită utilizarea unei balanțe cu două platane, a unui picnometru și a unei sticle utilizate ca tară cu același volum exterior pentru a elimina efectul de flotabilitate al aerului în orice moment. Această tehnică simplă poate fi aplicată utilizând o balanță cu un singur platan, cu condiția ca sticla utilizată ca tară să fie cântărită din nou pentru a monitoriza modificările efectul de flotabilitate al aerului în timp.

A.4. **Mod de lucru**

Observații preliminare:

Procedura următoare este descrisă pentru utilizarea unui picnometru de 100 ml la determinarea tăriei alcoolice; acesta conferă cele mai exacte rezultate. Totuși, este posibil și să se utilizeze un picnometru mai mic, de exemplu de 50 ml.

A.4.1. Calibrarea picnometrului

Picnometrul se calibrează prin determinarea următorilor parametri:

— tara picnometrului gol;

— volumul picnometrului la 20 °C;

— masa picnometrului umplut cu apă la 20 °C.

A.4.1.1. Calibrarea cu ajutorul unei balanțe cu un singur platan:

Se determină:

▼B

— masa picnometrului curat și uscat (P);

— masa picnometrului umplut cu apă la t °C (P1);

— masa sticlei utilizate ca tară (T0).

A.4.1.1.1. Se cântărește picnometrul curat și uscat (P).

A.4.1.1.2. Se umple picnometrul atent cu apă distilată la temperatura ambiantă și se atașează termometrul.

Se șterge cu grijă picnometrul până este uscat și se instalează în mantaua izolată termic. Se agită răsturnând containerul până când termometrul indică o temperatură constantă.

Se așează picnometrul astfel încât să se îmbine cu marginea superioară a tubului lateral. Se citește temperatura t °C și, dacă este necesar, se corectează posibilele inadvertențe ale gradației temperaturii.

Se cântărește picnometrul umplut cu apă (P1).

A.4.1.1.3. Se cântărește sticla utilizată ca tară (T0).

A.4.1.1.4. Calcule

— tara picnometrului gol = P – m

unde m reprezintă masa aerului din picnometru.

m = 0,0012 × (P1 – P)

Nota 2: 0,0012 reprezintă densitatea aerului uscat la 20 °C la o presiune de 760 mm Hg

— volumul picnometrului la 20 °C:

$$V_{20\,^{\circ}C} = [P1 - (P - m)] \times F_t,1$$

unde F_t reprezintă factorul pentru temperatura la t °C din tabelul 1 capitolul 1 „Densitatea și densitatea specifică” din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 (p. 10).

$V_{20\,^{\circ}C}$ trebuie să fie cât mai apropiat de 0,001 ml.

— Masa apei în picnometru la 20 °C:

$M_{20\,^{\circ}C} = V_{20\,^{\circ}C} \times 0{,}998203$ unde 0,998203 reprezintă densitatea apei la 20 °C.

Nota 3: Dacă este necesar, poate fi utilizată valoarea 0,99715 a densității aerului iar tăria alcoolică se calculează pe baza densității echivalente din tabelele Accize și Vame HM pentru aer.

A.4.1.2. Metodă de calibrare utilizând o balanță cu două platane:

A.4.1.2.1. Se plasează sticla utilizată ca tară pe platanul din stânga, iar picnometru curat și uscat cu opritorul colector pe platanul din dreapta. Se echilibrează cele două platane plasând greutăți pe cel care conține picnometrul: p grame.

A.4.1.2.2. Se umple picnometrul atent cu apă distilată la temperatura ambiantă și se atașează termometrul; se șterge cu grijă picnometrul până este uscat și se instalează în mantaua izolată termic; se agită răsturnând containerul până când termometrul indică o temperatură constantă.

Se reglează nivelul cu exactitate până la marginea superioară a tubului lateral. Se curăță tubul lateral, se atașează opritorul colector; se citește temperatura t °C și, dacă este necesar, se corectează posibilele inadvertențe ale gradației temperaturii.

Se cântărește picnometrul umplut cu apă, compensând pentru echilibrare cu *p′* greutatea în grame.

A.4.1.2.3. Calcule

— tara picnometrului gol = p + m

unde m reprezintă masa aerului din picnometru.

▼B

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

— volumul picnometrului la 20 °C:

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

unde F_t reprezintă factorul pentru temperatura la t °C din tabelul 1 capitolul 1 „Densitatea și densitatea specifică" din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 (p. 10).

$V_{20\,°C}$ trebuie să fie cât mai apropiat de 0,001 ml.

— Masa apei în picnometru la 20 °C:

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ unde 0,998203 reprezintă densitatea apei la 20 °C.

A.4.2. Determinarea tăriei alcoolice a probei de testare

A.4.2.1. Utilizând o balanță cu un singur platan.

A.4.2.1.1. Se cântărește sticla utilizată ca tară, greutate T1.

A.4.2.1.2. Se cântărește picnometrul cu distilatul preparat (a se vedea anexa I), P2 reprezintă greutatea la t °C.

A.4.2.1.3. Calcule

— dT = T1 - T0

— Masa picnometrului gol în momentul măsurării

= P – m + dT

— Masa lichidului din picnometru la t °C

= P2 – (P – m + dT)

— Densitatea la t °C în g/ml

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

— Se exprimă densitatea la t °C în kilograme pe m^3 prin înmulțirea $\rho_{t\,°C}$ cu 1 000, valoarea fiind cunoscută ca ρ_t.

— Se corectează ρ_t la 20 folosind tabelul densităților ρ_T pentru amestecuri de apă-alcool [tabelul II din apendicele II la manualul OIV de metode de analiză (1994), p. 17-29].

Se caută în tabel linia care corespunde temperaturii T în grade fără zecimale, aflată imediat sub t °C, cea mai mică densitate peste ρ_t. Se folosește diferența din tabel găsită sub această densitate pentru a calcula densitatea ρ_t a alcoolului la temperatura T în cauză, în grade fără zecimale.

— Folosind linia pentru temperatura fără zecimale se calculează diferența dintre densitatea ρ' din tabel imediat deasupra ρ_t și densitatea calculată ρ_t. Se împarte această diferența la diferența din tabel care se află la dreapta densității ρ'. Coeficientul indică porția zecimală a tăriei alcoolice, iar întregul tăriei alcoolice se află în partea superioară a coloanei în care se află densitatea ρ' (Dt, tăria alcoolică).

Nota 4: Alternativ, se păstrează picnometrul într-o baie de apă menținută la 20 °C (± 0,2 °C) atunci când se completează până la marcaj.

A.4.2.1.4. Rezultat

Folosind densitatea ρ_{20} se calculează tăria alcoolică reală pe baza tabelelor pentru tăria alcoolică identificate în continuare:

Tabelul care indică valoarea tăriei alcoolice în volume (% vol) la 20 °C ca funcție a densității la 20 °C a amestecurilor de apă-alcool este tabelul internațional adoptat de Organizația Internațională de Metrologie Legală în Recomandarea nr. 22.

A.4.2.2. Metoda care folosește balanța cu un singur platan.

A.4.2.2.1. Se cântărește picnometrul cu distilatul preparat (vezi partea I), ρ'' este masa la t °C.

▼B

A.4.2.2.2. Calculul

— Masa lichidului din picnometru la t °C

$= \rho + m - \rho''$

— Densitatea la t °C în g/ml

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

— Se exprimă densitatea la t °C în kilograme pe m^3 și se efectuează corectarea temperaturii pentru a calcula tăria alcoolică la 20 °C, așa cum este indicat anterior pentru folosirea balanței cu un singur platan.

A.5. **Caracteristici de performanță ale metodei (precizia)**

A.5.1. Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Următoarele date au fost obținute dintr-un studiu internațional de performanță a metodei efectuat cu proceduri acceptate la nivel internațional [1] [2].

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	20
Numărul de probe	6

Probe	A	B	C	D	E	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	19	20	17	19	19	17
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	1	-	2	1	1	3
Numărul rezultatelor acceptate	38	40	34	38	38	34
Valoarea medie ($\bar{n}$) % vol	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Standard de repetabilitate (S_r) % vol	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Limită de repetabilitate (r) în % vol	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) % vol	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Limita de reproductibilitate (R) în % vol	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Tipuri de probe
A Lichior de fructe: nivel de divizare (*).
B Brandy: duplicate oarbe.
C Whisky: duplicate oarbe.
D Grappa: nivel de divizare (*).
E Aquavit: nivel de divizare (*).
F Rom: nivel de divizare (*).

METODA B: DETERMINAREA TĂRIEI ALCOOLICE REALE ÎN VOLUME PENTRU BĂUTURILE SPIRTOASE – MĂSURARE PRIN DENSITOMETRIE ELECTRONICĂ (BAZATĂ PE OSCILAȚIA FRECVENȚEI REZONANTE A UNEI PROBE ÎNTR-O CELULĂ DE OSCILARE)

B.1. **Principiu**

Densitatea lichidului este determinată prin măsurători electronice ale oscilațiilor unui tub vibrator sub formă de U. Pentru a efectua aceste

▼B

măsurători, proba este adăugată unui sistem de oscilații a cărui frecvență de oscilare este astfel modificată de masa adăugată.

B.2. **Reactivi și materiale**

Pe timpul analizei, dacă nu se specifică altfel, se utilizează numai reactivi cu grad analitic recunoscut și cu apă de cel puțin gradul 3, conform definiției din ISO 3696:1987.

B.2.1. Acetonă (CAS 666-52-4) sau alcool absolut

B.2.2. Aer uscat

B.3. **Aparatură și echipamente**

Aparate de laborator obișnuite și, în special, următoarele aparate:

B.3.1. Densitometru cu afișaj digital

Densitometrul electronic pentru efectuarea acestor măsurători trebuie să poată exprima densitatea în g/ml cu 5 zecimale.

Nota 1: Densitometrul trebuie să fie așezat pe o suprafață perfect stabilă, izolată de vibrații.

B.3.2. Reglarea temperaturii

Performanța densitometrului este valabilă numai dacă celula de măsurare este conectată la un regulator de temperatură încorporat care poate atinge aceeași stabilitate a temperaturii la ± 0,02 °C sau mai puțin.

Nota 2: Stabilirea și monitorizarea precise ale temperaturii în celula de măsurare sunt foarte importante deoarece o eroare a 0,1 ° C poate determina o variație a densității de 0,1 kg/m^3.

B.3.3. Seringi de injectare a probei sau dispozitiv de autoprelevare de probe.

B.4. **Mod de lucru**

B.4.1. Calibrarea densitometrului

Aparatul se calibrează conform instrucțiunilor producătorului instrumentului la prima punere în funcțiune. Trebuie să se recalibreze în mod regulat și să se verifice pe baza unui standard de referință certificat sau a unei soluții de referință interne de laborator bazată pe un standard de referință certificat.

B.4.2. Determinarea densității probei

B.4.2.1. Dacă este necesar, înainte de măsurare se curăță și se usucă celula cu acetonă sau cu alcool absolut și aer uscat. Se clătește celula cu proba de testare.

B.4.2.2. Se injectează proba în celulă (utilizând o seringă sau un dispozitiv de autoprelevare de probe) până la umplerea completă a celulei. În timpul operației de umplere se verifică dacă sunt eliminate toate bulele de aer. Proba trebuie să fie omogenă și să nu conțină particule solide. Particulele materiale în suspensie se elimină prin filtrare înainte de efectuarea analizei.

B.4.2.3. După stabilizarea indicatorului, se notează densitatea ρ_{20} sau tăria alcoolică afișată de densitometru.

B.4.3. Rezultat

Dacă se folosește densitatea $\rho_{20,}$ tăria alcoolică reală se calculează cu ajutorul tabelelor de tărie alcoolică identificate în continuare.

Tabelul care cuprinde valoarea tăriei alcoolice în volume (% vol) la 20 °C ca funcție a densității la 20 °C a amestecurilor de apă-alcool este tabelul adoptat de Organizația Internațională Legală de Metrologie în Recomandarea nr. 22.

▼B

B.5. **Caracteristici de performanță ale metodei (precizia)**

B.5.1. Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Următoarele date au fost obținute dintr-un studiu internațional de performanță a metodei efectuat cu proceduri acceptate la nivel internațional [1] [2].

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	16
Numărul de probe	6

Probe	A	B	C	D	E	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	11	13	15	16	14	13
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	2	3	1	-	1	2
Numărul rezultatelor acceptate	22	26	30	32	28	26
Valoarea medie ($\bar{n}$) % vol	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) % vol	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Limită de repetabilitate (r) în % vol	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) % vol	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Limita de reproductibilitate (R) în % vol	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Tipuri de probe
A Lichior de fructe: nivel de divizare (*).
B Brandy: duplicate oarbe.
C Whisky: duplicate oarbe.
D Grappa: nivel de divizare (*).
E Aquavit: nivel de divizare (*).
F Rom: nivel de divizare (*).

METODA C: DETERMINAREA TĂRIEI ALCOOLICE REALE ÎN VOLUME A BĂUTURILOR SPIRTOASE – MĂSURAREA PRIN DENSITOMETRIE CU AJUTORUL BALANȚEI HIDROSTATICE

C.1. **Principiu**

Tăria alcoolică a băuturilor spirtoase poate fi măsurată prin densitometrie au ajutorul unei balanțe hidrostatice bazată pe principiul lui Arhimede conform căruia un corp scufundat într-un lichid este împins la suprafață de o cantitate de lichid egală cu greutatea lichidului dislocat.

C.2. **Reactivi și materiale**

Pe timpul analizei, dacă nu se specifică altfel, se folosesc numai reactivi cu grad analitic recunoscut și cu apă de cel puțin gradul 3, conform definiției din ISO 3696:1987.

C.2.1. Soluție de curățare a flotorului (hidroxid de sodiu, 30 % m/v)

Pentru a prepara 100 ml, se cântăresc 30 g de hidroxid de sodiu și se completează cu etanol 96 % vol.

▼B

C.3. **Aparatură și echipamente**

Aparate de laborator obișnuite și, în special, următoarele:

C.3.1. Balanță hidrostatică cu un singur platan cu sensibilitate de 1 mg.

C.3.2. Flotor cu un volum de cel puțin 20 ml, adaptat special pentru balanță, suspendat de un fir cu diametru de maximum 0,1 mm.

C.3.3. Cilindru gradat cu marcaj pentru nivel. Flotorul trebuie să poată fi conținut complet în volumul cilindrului situat sub marcaj; suprafața lichidului poate fi penetrată numai de firul de susținere. Cilindrul gradat trebuie să aibă un diametru intern de minimum 6 mm mai mare decât diametrul flotorului.

C.3.4. Termometru (sau probă de măsurare a temperaturii) gradat cu grade și zecimi de grade de la 10 la 40 °C, calibrat la 0,05 °C.

C.3.5. Greutăți, calibrate de un organism de certificare recunoscut.

Nota 1: Se poate folosi și o balanță cu un singur platan; principiul este descris în capitolul I „Densitatea și gravitatea specifică" din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 (p. 7).

C.4. **Mod de lucru**

Flotorul și cilindrul gradat trebuie să se curețe, după fiecare măsurare, cu apă distilată, să se usuce cu hârtie moale de laborator care nu lasă fire și să se clătească cu soluție a cărei densitate urmează să fie determinată. Măsurările se efectuează în momentul în care aparatul este stabil pentru a limita pierderile de alcool cauzate de evaporare.

C.4.1. Calibrarea balanței

Deși în mod obișnuit balanțele au un sistem intern de calibrare, balanța hidrostatică trebuie să poată efectua calibrarea cu greutățile verificate de un organism de certificare oficial.

C.4.2. Calibrarea flotorului

C.4.2.1. Se umple cilindrul gradat până la marcaj cu apă dublu distilată (sau apă cu puritate echivalentă, adică apă microfiltrată cu conductibilitate de 18,2 MΩ/cm) la o temperatură între 15 și 25 °C, de preferință 20 °C.

C.4.2.2. Se scufundă flotorul și termometrul, se amestecă, se citește densitatea lichidului din aparat și, dacă este necesar, se corectează indicația astfel încât aceasta să fie egală cu cea a apei la temperatura de măsurare.

C.4.3. Se controlează folosind o soluție de apă-alcool.

C.4.3.1. Se umple cilindrul gradat până la marcaj cu un amestec de apă-alcool cu tărie cunoscută la o temperatură între 15 și 25 °C, de preferință 20 °C.

C.4.3.2. Se scufundă flotorul și termometrul, se amestecă, se citește densitatea lichidului (sau tăria alcoolică, dacă este posibil) din aparat. Tăria alcoolică astfel stabilită trebuie să fie egală cu tăria alcoolică determinată anterior.

Notă 2: Această soluție cu tărie alcoolică cunoscută poate fi folosită și la calibrarea flotorului în locul apei dublu distilate.

C.4.4. Măsurarea densității distilatului (sau a tăriei alcoolice, dacă aparatul permite aceasta).

C.4.4.1. Se toarnă proba de testare într-un cilindru gradat până la marcaj.

C.4.4.2. Se scufundă flotorul și termometrul, se amestecă, se citește densitatea lichidului (sau tăria alcoolică, dacă este posibil) din aparat. Se notează temperatura dacă densitatea se măsoară la t °C (ρ_t).

C.4.4.3. Se corectează ρ_t la 20 folosind tabelul de densități ρT pentru amestecurile apă-alcool (tabelul II din anexa II la Manualul OIV de metode de analize (1994), pp. 17-29).

C.4.5. Curățarea flotorului și a cilindrului gradat.

C.4.5.1. Se cufundă flotorul în soluția de curățare a flotorului în cilindrul gradat.

▼B

C.4.5.2. Se lasă să se înmoaie timp de o oră, rotind periodic flotorul.

C.4.5.3. Se clătește cu multă apă de la robinet, apoi cu apă distilată.

C.4.5.4. Se usucă cu hârtie moale de laborator care nu lasă scame.

Această procedură se efectuează după prima utilizare a flotorului, apoi ori de câte ori este cazul.

C.4.6. Rezultat

Cu ajutorul densității ρ_{20} se calculează tăria alcoolică reală folosind tabelele de tărie alcoolică menționate mai jos.

Tabelul care cuprinde valoarea tăriei alcoolice în volume (% vol) la 20 °C ca funcție a densității la 20 °C a amestecurilor de apă-alcool este tabelul adoptat de Organizația Internațională Legală de Metrologie în Recomandarea nr. 22.

C.5. **Caracteristici de performanță ale metodei (precizia)**

C.5.1. Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Următoarele date au fost obținute dintr-un studiu internațional de performanță a metodei efectuat cu proceduri acceptate la nivel internațional [1] [2].

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	12
Numărul de probe	6

Probe	A	B	C	D	E	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	12	10	11	12	11	9
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	-	2	1	-	1	2
Numărul rezultatelor acceptate	24	20	22	24	22	18
Valoarea medie ($\bar{n}$) % vol	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) % vol	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Limită de repetabilitate (r) în % vol	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) % vol	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Limita de reproductibilitate (R) în % vol	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Tipuri de probe
A Lichior de fructe: nivel de divizare (*).
B Brandy: duplicate oarbe.
C Whisky: duplicate oarbe.
D Grappa: nivel de divizare (*).
E Aquavit: nivel de divizare (*).
F Rom: nivel de divizare (*).

▼B

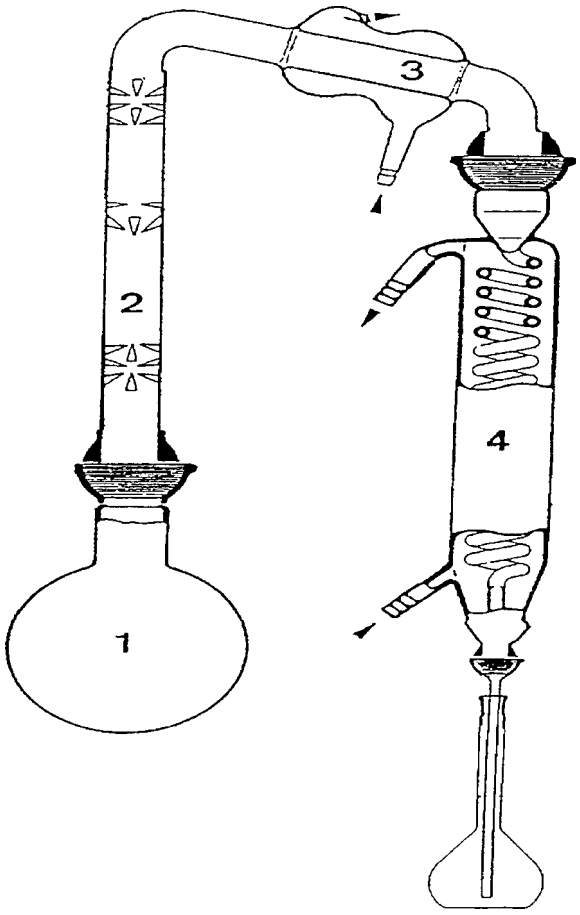


Figura 1. Aparat de distilare pentru măsurarea tăriei alcoolice reale în volume a băuturilor spirtoase

1. Balon de sticlă de 1 litru cu fundul rotund cu îmbinare sferică standardizată de sticlă rodată.

2. Coloană de rectificare tip „Vigreux” de 20 cm.

3. Condensator West cu margine dreaptă de 10 cm.

4. Spirală de răcire de 40 cm.

▼B

II. DETERMINAREA EXTRACTULUI SEC TOTAL AL BĂUTURILOR SPIRTOASE PRIN GRAVIMETRIE

1. **Domeniu**

Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 prevede această metodă numai pentru aquavit pentru care extractul sec este limitat la 15 g/l.

2. **Referințe normative**

ISO 3696:1987: Apă pentru uzul laboratorului – specificații și metode de testare.

3. **Definiție**

Extractul sec total sau materia uscată totală include toată materia nevolatilă în condiții fizice specificate.

4. **Principiu**

Cântărirea reziduului rămas după evaporarea alcoolului pe o baie de apă la fierbere și uscarea într-un cuptor de uscare.

5. **Aparatură și echipamente**

5.1. Capsulă cilindrică de evaporare cu fundul plat cu diametru de 35 mm.

5.2. Baie cu apă la fiebere.

5.3. Pipetă de 25 ml, clasa A.

5.4. Cuptor de uscare.

5.5. Desicator.

5.6. Balanță analitică cu precizie de 0,1 mg.

6. **Prelevare și probe**

Probele se păstrează la temperatura camerei înainte de analiză.

7. **Mod de lucru**

7.1. Se pipetează 25 ml de alcool care conține sub 15 g/l materie uscată într-o placă cilindrică de evaporare cu fundul plat cu diametru de 55 mm. În timpul primei ore de evaporare placa de evaporare se plasează pe capacul unei băi de apă la fierbere în așa fel încât lichidul să nu fiarbă, deoarece ar duce la pierderi prin stropire. Se lasă încă o oră în contact direct cu vaporii băii de apă la fierbere.

7.2. Se finalizează uscarea așezând placa de evaporare într-un cuptor de uscare la 105 °C ± 3 °C timp de două ore. Se lasă placa de evaporare să se răcească într-un desicator și se cântărește placa de evaporare și conținutul acesteia.

8. **Calcule**

Masa reziduului înmulțită cu 40 este egală cu conținutul uscat din alcool și trebuie să fie exprimată în g/l până la o zecimală.

9. **Caracteristici de performanță ale metodei (precizia)**

9.1. Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Următoarele date au fost obținute dintr-un studiu internațional de performanță a metodei efectuat cu proceduri acceptate la nivel internațional [1] [2].

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	10
Numărul de probe	4

▼B

Probe	A	B	C	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	9	9	8	9
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	1	1	2	-
Numărul rezultatelor acceptate	18	18	16	18
Valoarea medie ($\bar{n}$) % vol	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Deviație standard de repetabilități (S_r) % vol	0,075	0,441	0,028	0,123
Deviația standard relativă de repetabilități (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Limită de repetabilități (r) în % vol	0,2	1,2	0,1	0,3
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) % vol	0,148	0,451	0,058	0,210
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Limita de reproductibilitate (R) în % vol	0,4	1,3	0,2	0,6

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate oarbe.
B Rom: nivel de divizare.
C Grappa: nivel de divizare.
D Aquavit: nivel de divizare.

▼B

III. DETERMINAREA SUBSTANȚELOR VOLATILE ȘI A METANOLULUI DIN BĂUTURILE SPIRTOASE

III.1 OBSERVAȚII GENERALE

1. **Definiții**

Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 stabilește nivelurile minime de compuși volatili, alții decât etanolul și metanolul, pentru mai multe băuturi spirtoase (rom, alcooluri de origine viticolă, alcooluri din fructe etc.). Numai pentru aceste băuturi spirtoase, aceste niveluri sunt considerate, în mod convențional, echivalente cu suma concentrațiilor de:

1. acizi volatili exprimați ca acid acetic;

2. aldehide exprimate ca etanal prin suma etanalului (acetaldehidă) și a fracției de etanal conținută în 1,1 dietoxietan (acetal);

3. următoarele alcooluri superioare: propan-1-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metilpropan-1-ol, evaluate ca alcool individual și 2-metilbutan-1-ol, și 3-metilbutan-1-ol evaluat ca alcool individual sau ca suma celor două;

4. acetat de etil.

Următoarele metode convenționale se folosesc pentru măsurarea compușilor volatili:

— acizii volatili prin aciditate volatilă;

— aldehidele (etanal și acetal), acetatul de etil și alcoolurile prin cromatografie cu gaz (GPC).

2. **Analiza prin cromatografia gazoasă a compușilor volatili**

Evaluările prin cromatografia gazoasă a compușilor volatili, alții decât cei menționați anterior, se pot dovedi a fi extrem de interesante ca mijloace de determinare a originii materiei prime folosite în distilare și a condițiilor de distilare efective.

Unele alcooluri conțin alte componente volatile, cum ar fi compuși aromatici, care sunt caracteristici materiilor prime folosite la obținerea alcoolului, aromei băuturii spirtoase și caracteristicilor speciale ale preparării alcoolului. Acești compuși sunt importanți pentru evaluarea cerințelor stabilite în Regulamentul (CEE) nr. 1576/89.

III.2. DETERMINAREA PRIN CROMATOGRAFIA GAZOASĂ A CONGENERILOR VOLATILI: ALDEHIDE, ALCOOLURI SUPERIOARE, ACETAT DE ETIL ȘI METANOL

1. **Domeniu**

Această metodă este potrivită pentru a se determinarea 1,1 dietoxietan (acetal), 2-metilbutan-1-ol (alcool amil activ), 3-metilbutan-1-ol (alcool izoamil), metanolul (alcool metilic), etil etanoat (etil acetat), butan-1-ol (n-butanol), butan-2-ol (sec-butanol), 2-metilpropan-1-ol (alcool izobutil), propan-1-ol (n-propanol) și etanal (acetaldehidă) din băuturile spirtoase folosind cromatografia gazoasă. Metoda folosește un standard intern, de exemplu pentan-3-ol. Concentrațiile analiților sunt exprimate în grame pe 100 litri de alcool absolut; tăria alcoolică a produsului trebuie să se determine înainte de analiză. Băuturile spirtoase care pot fi analizate folosind această metodă includ whisky, brandy, rom, rachiu de vin, rachiu de fructe și rachiu de tescovină.

2. **Trimiteri normative**

ISO 3696:1987: Apă pentru uzul laboratorului – specificații și metode de testare.

3. **Definiție**

Congenerii sunt substanțe volatile formate în același timp cu etanolul pe parcursul fermentației, distilării și maturării băuturilor spirtoase.

▼B

4. **Principiu**

Congenerii din băuturile spirtoase sunt determinați prin injectarea directă a băuturii spirtoase sau a băuturii spirtoase diluate corespunzător într-un sistem de cromatografie cu gaz (GC). Un standard intern corespunzător se adaugă băuturii spirtoase înainte de injectare. Congenerii sunt separați prin programarea temperaturii pe o coloană adecvată și sunt detectați folosind un detector de ionizare cu flacără (FID). Concentrația fiecărui congener este determinată luându-se în considerare standardul intern al factorilor de răspuns care sunt obținuți în timpul calibrării în același condiții cromatografice ca și cele pentru analiza băuturilor spirtoase.

5. **Reactivi și materiale**

Dacă nu există alte specificații, folosiți numai reactivi cu o puritate de peste 97 %, achiziționați de la un furnizor acreditat ISO cu certificat de puritate, care nu prezintă congeneri la diluția test (acest lucru poate fi confirmat prin injectarea de standarde de congener individuale la diluția test folosind condițiile de GC de la punctul 6.4) și numai apă de cel puțin 3 grade conform definiției din ISO 3696. Acetalul și acetaldehida se păstrează la întuneric, la < 5 °C, toți ceilalți reactivi pot fi păstrați la temperatura camerei.

5.1. Etanol absolut (CAS 64-17-5).

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

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

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

5.5. Standarde interne acceptabile: pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-metilpentan-1-ol (CAS 626-89-1) sau metil nonanoat (CAS 1731-84-6).

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

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

5.8. acetat de etil (CAS 141-78-6).

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

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

5.11. Acetaldehidă (CAS 75-07-0).

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

5.13. Soluție de etanol 40 % v/v

Pentru a prepara 400 ml/l soluție de etanol se toarnă 400 ml de etanol (5.1) într-un balon volumetric de 1 litru, se completează cu apă distilată și se amestecă.

5.14. Prepararea și păstrarea soluțiilor standard (procedura folosită pentru metoda validată).

Toate soluțiile standard pot fi păstrate la < 5 °C și pot fi proaspăt preparate lunar. Masele componentelor și ale soluțiilor trebuie să fie înregistrate cu o precizie de 0,1 mg.

5.14.1. Soluția standard – A

Se pipetează următorii reactivi într-un balon volumetric de 100 ml care conține aproximativ 60 ml soluție de etanol (5.13) pentru a minimaliza evaporarea componentei, se completează cu soluție de etanol (5.13) și se amestecă bine. Se notează greutatea balonului, fiecare componentă adăugată și greutatea finală totală a conținutului.

Componentă	Volum (ml)
Metanol (5.2)	3,0
Propan-1-ol (5.3)	3,0
2-metilpropan-1-ol (5.4)	3,0

▼B

Componentă	Volum (ml)
2-metilbutan-1-ol (5.6)	3,0
3-metilbutan-1-ol (5.7)	3,0
Acetat de etil (5.8)	3,0
Butan-1-ol (5.9)	3,0
Butan-2-ol (5.10)	3,0
Acetaldehidă (5.11)	3,0
Acetal (5.12)	3,0

Nota 1: Se recomandă adăugarea acetalului și a acetaldehidei la sfârșit pentru a minimiza pierderile prin evaporare.

5.14.2. Soluția standard – B

Se pipetează 3 ml de pentan-3-ol sau alt standard intern corespunzător (5.5) într-un balon volumetric de 100 ml care conține aproximativ 80 ml de soluție de etanol (5.13), se completează cu soluție de etanol (5.13) și se amestecă bine.

Se notează greutatea balonului, greutatea pentan-3-olului sau a altui standard intern adăugat și greutatea finală totală a conținutului.

5.14.3 Soluția standard – C

Se pipetează 1 ml de soluție A (5.14.1) și 1 ml de soluție B (5.14.2) într-un balon volumetric de 100 ml care conține aproximativ 80 ml de soluție de etanol (5.13), se completează cu soluție de etanol (5.13) și se amestecă bine.

Se notează greutatea balonului, a fiecărei componente adăugate și greutatea finală totală a conținutului.

5.14.4. Soluția standard – D

Pentru a menține continuitatea analitică, se prepară un standard de control de calitate folosind standardul A preparat anterior (5.14.1). Se pipetează 1 ml de soluție A (5.14.1) într-un balon volumetric de 100 ml care conține aproximativ 80 ml de soluție de etanol (5.13), se completează cu soluție de etanol (5.13) și se amestecă bine.

Se notează greutatea balonului, a fiecărei componente adăugate și greutatea finală totală a conținutului.

5.14.5. Soluția standard – E

Se pipetează 1 ml de soluție B (5.14.2) într-un balon volumetric de 100 ml care conține aproximativ 80 ml de soluție de etanol (5.13), se completează cu soluție de etanol (5.13) și se amestecă bine.

Se notează greutatea balonului, a fiecărei componente adăugate și greutatea finală totală a conținutului.

5.14.6. Soluții standard folosite la verificarea liniarității răspunsului FID

În baloane volumetrice de 100 ml diferite, care conțin aproximativ 80 ml de soluție de etanol (5.13) se pipetează 0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 ml de soluție A (5.14.1) și 1 ml de soluție B (5.14.2), se completează cu soluție de etanol (5.13) și se amestecă bine.

Se notează greutatea balonului, a fiecărei componente adăugate și greutatea finală totală a conținutului.

5.14.7. Soluție standard de control al calității

Se pipetează 9 ml de soluție standard D (5.14.4) și 1 ml de soluție E (5.14.5) într-un vas de cântărire și se amestecă bine.

Se notează greutatea balonului, a fiecărei componente adăugate și greutatea finală totală a conținutului.

6. **Aparatură și echipamente**

6.1. Aparatură de măsurare a densității și a tăriei alcoolice.

▼B

6.2. Balanță analitică de măsurare cu patru zecimale.

6.3. Un cromatograf cu gaz cu temperatura programată echipat cu un detector și integrator de ionizare cu flacără sau alte sisteme de tratare a datelor care pot măsura platourile de maxim și vârfurile de maxim.

6.4. Coloană (coloane) de gaz cromatografie ce pot separa analiții astfel încât rezoluția minimă dintre componentele individuale (altele decât 2-metilbutan-1-ol și 3-metilbutan-1-ol) să fie de minimum 1,3.

Nota 2: Următoarele coloane și condiții GC reprezintă exemple potrivite:

1. O cavitate de retenție 1 m × 0,32 mm i.d. conectată la o coloană CP-WAX 57 CB de 50 m × 0.32 mm i.d., grosimea filmului de 0,2 µm (polietilenă glicol stabilizat), urmată de o coloană Carbowax 400 de 50 m × 0,32 mm i.d., grosimea filmului de 0,2 µm. (Coloanele sunt conectate cu ajutorul conectorilor apăsare-fixare.)

Gaz transportor și presiune:	Heliu (135 kPa)
Temperatură coloană:	35 °C timp de 17 min., 35-70 °C la 12 °C/min., se menține la 70 °C timp de 25 min.
Temperatură injector:	150 °C
Temperatură detector:	250 °C
Volum de injectare:	1 µl, se divizează 20 la 100:1

2. O cavitate de retenție 1 m × 0,32 mm i.d. conectată la o coloană CP-WAX 57 CB de 50 m × 0.32 mm i.d., grosimea filmului de 0,2 µm (polietilenă glicol stabilizat). (Cavitatea de retenție este conectată cu ajutorul unui conector apăsare-fixare.)

Gaz transportor și presiune:	Heliu (65 kPa)
Temperatură coloană:	35 °C timp de 10 min., 35-110 °C la 5 °C/min., 110-190 °C la 30 °C/min., se menține la 190 °C timp de 2 min.
Temperatură injector:	260 °C
Temperatură detector:	300 °C
Volum de injectare:	1 µl, se divizează 55:1

3. O coloană împachetată (5 % CW 20M, Carbopak B), 2 m × 2 mm diametru interior

Temperatură coloană:	65 °C timp de 4 min., 65-140 °C la 10 °C/min., se menține la 140 °C timp de 5 min., 140-150 °C la 5 °C/min., se menține la 150 °C timp de 3 min.
Temperatură injector:	65 °C
Temperatură detector:	200 °C
Volum de injectare:	1 µl

7. **Prelevare și probe**

7.1. Probă de laborator

La primire se măsoară tăria alcoolică a fiecărei probe (6.1).

▼B

8. **Mod de lucru (folosit pentru metoda validată)**

8.1. Porțiune de testare

8.1.1. Se cântărește un vas de cântărire corespunzător sigilat și se notează greutatea.

8.1.2. Se pipetează 9 ml de probă de laborator în vas și se notează greutatea ($M_{PROBĂ}$).

8.1.3. Se adaugă 1 ml de soluție standard E (5.14.5) și se notează greutatea (M_{IS}).

8.1.4. Se agită puternic materialul de testare (cel puțin 20 de inversări). Probele trebuie să se păstreze la sub 5 °C înainte de analiză pentru a minimiza pierderile prin volatilizare.

8.2. Test martor

8.2.1. Folosind balanța cu patru zecimale (6.2), se cântărește vasul de cântărire corespunzător sigilat și se notează greutatea.

8.2.2. Se pipetează 9 ml de soluție de etanol 400 ml/l (5.13) și se notează greutatea.

8.2.3. Se adaugă 1 ml de soluție standard E (5.14.5) și se notează greutatea.

8.2.4. Se agită puternic materialul de testare (cel puțin 20 de inversări). Probele trebuie să se păstreze la sub 5 °C înainte de analiză pentru a minimiza pierderile prin volatilizare.

8.3. Test preliminar

Se injectează soluție standard C (5.14.3) pentru a se asigura că toți analiții sunt separați cu o rezoluție minimă de 1,3 (cu excepția 2-metilbutan-1-olului și a 3-metilbutan-1-olului).

8.4. Calibrare

Calibrarea trebuie să se verifice folosind următoarea procedură. Se asigură un răspuns liniar prin analiza succesivă a trei exemplare din fiecare soluție standard de liniaritate (5.14.6.) care conține standard intern (IS). Din platourile de maxim sau vârfurile de maxim ale integratorului pentru fiecare injectare se calculează raportul R pentru fiecare congener și se realizează un grafic pentru R versus rata de concentrație a congenerului față de standardul intern (IS). Trebuie să se obțină o diagramă liniară cu un coeficient de corelare de cel puțin 0,99.

$$R = \frac{\text{Platou sau vârf de maxim al congenerului}}{\text{Platou sau vârf de maxim al IS}}$$

$$C = \frac{\text{Concentrația congenerului (µg/g)}}{\text{Concentrația IS (µg/g)}}$$

8.5. Determinarea

Se injectează soluție standard C (5.14.3) și 2 soluții standard QC (5.14.7). Se continuă cu probe necunoscute (preparate conform 8.1 și 8.2), inserând un standard QC la fiecare zece probe pentru a asigura stabilitatea analitică. Se injectează o soluție standard C (5.14.3) după fiecare 5 probe.

9. **Calcule**

Se poate folosi un sistem automat de tratare a datelor, cu condiția ca datele să poată fi verificate cu ajutorul principiilor descrise în metoda menționată în continuare.

Se măsoară fiecare platou sau vârf de maxim pentru congener și vârfurile standardului intern.

9.1. Calcularea factorului de răspuns.

Din cromatograma injectării de soluție standard C (5.14.3), se calculează factorii de răspuns pentru fiecare congener folosind ecuația (1).

▼B

$$(1)\ \text{Factor de răspuns} = \frac{\text{Platou sau vârf de maxim IS}}{\text{Platou sau vârf de maxim al congenerului}} \times \frac{\text{Conc. Congener (µg/g)}}{\text{Conc. IS (µg/g)}}$$

unde:

IS = Standard intern

Conc. Congener = concentrația de congener în soluția C (5.14.3)

Conc. IS = concentrația standardului intern în soluția C (5.14.3).

9.1.2. Analiza probei

Folosind ecuația (2) menționată în continuare, se calculează concentrația fiecărui congener din probe.

$$(2)\ \text{Concentrațiile de congener (µg/g)} = \frac{\text{Platou sau vârf de maxim al congenerului}}{\text{Platou sau vârf de maxim IS}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{M_{PROBĂ}\ (g)} \times \text{Conc. IS (µg/g)} \times RF$$

unde:

$M_{PROBĂ}$ = greutatea probei (8.1.2);

M_{IS} = greutatea standardului intern (8.1.3);

Conc. IS = concentrația de standard intern în soluția E (5.14.5);

RF = factor de răspuns calculat folosind ecuația 1.

9.1.3. Analiza soluției standard de control al calității

Folosind ecuația (3) menționată în continuare, se calculează recuperarea procentuală a valorii țintă pentru fiecare congener în standardele de control al calității (5.14.7):

$$(^3)\ \%\ \text{de recuperare a eșantionului QC} = \frac{\text{concentrația analitului în standard QC}}{\text{concentrația analitului în soluția D}} \times 100$$

Concentrația analitului în standardul QC se calculează folosind ecuațiile (1) și (2) menționate anterior.

9.2. Prezentarea finală a rezultatelor

Rezultatele sunt convertite din µ/g în g la 100 litri alcool absolut pentru probe, folosindu-se ecuația (4):

$$(4)\ \text{Concentrația în g la 100 litri alcool absolut} = \text{Conc. (µg/g)} \times \rho \times 10/[\text{tărie (\% vol)} \times 1\ 000]$$

unde

ρ = densitatea în kg/m^3.

Rezultatele se menționează cu 3 cifre semnificative și maxim o zecimală, de exemplu, 11,4 g la 100 l alcool absolut.

10. **Asigurarea calității și controlul calității (pentru metoda validată)**

Cu ajutorul ecuației (2) menționate anterior se calculează concentrația fiecărui congener din soluțiile standard de control al calității preparate conform procedurii de la 8.1.1-8.1.4. Cu ajutorul ecuației (3) se calculează procentul de recuperare a valorii țintă. Dacă rezultatele analizate se încadrează în ± 10 % din valorile teoretice pentru fiecare congener, se poate începe analiza. În caz contrar, se recomandă o investigație pentru a găsi cauza inexactității și pentru a lua măsuri de remediere corespunzătoare.

11. **Caracteristici de performanță ale metodei (precizia)**

Rezultatele statistice ale testului interlaboratoare: tabelele următoare prezintă valorile pentru următorii compuși: etanal, acetat de etil,

▼B

acetal, etanal total, metanol, butan-2-ol, propan-1-ol, butan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2 metil-butan-1-ol, 3 metil-butan-1-ol.

Următoarele date au fost obținute dintr-un studiu internațional de performanță a metodei efectuat cu proceduri acceptate la nivel internațional.

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5
Analit	etanal

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	28	26	27	27	28
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	2	4	3	3	2
Numărul rezultatelor acceptate	56	52	54	54	56
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4	28,6
				13,8 (*)	52,2 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Limită de repetabilitate (r) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5
Analit	acetat de etil

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	24	24	25	24	24
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	2	2	1	2	2
Numărul rezultatelor acceptate	48	48	50	48	48
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5	99,1
				91,8 (*)	117,0 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6

▼B

Probe	A	B	C	D	E
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Limită de repetabilitate (r) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5
Analit	acetal

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	20	21	22	17	21
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	4	3	2	4	3
Numărul rezultatelor acceptate	40	42	44	34	42
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36	15,1
				6,60 (*)	28,3 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Limită de repetabilitate (r) în µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5
Analit	etanal total

▼B

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	23	19	22	21	22
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	1	5	2	3	2
Numărul rezultatelor acceptate	46	38	44	42	44
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4	32,7
				15,8 (*)	61,8 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Limită de repetabilitate (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5
Analit	metanol

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	26	27	27	28	25
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	4	3	3	1	4
Numărul rezultatelor acceptate	52	54	54	56	50
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0	18,6
				61,5 (*)	28,9(*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Limită de repetabilitate (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8

▼B

Probe	A	B	C	D	E
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	4
Analit	butan-2-ol

Probe	A	B	C	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	21	27	29	22
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	4	3	1	3
Numărul rezultatelor acceptate	42	54	58	44
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Limită de repetabilitate (r) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5
Analit	propan-1-ol

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	29	27	27	29	29
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	2	4	3	2	2
Numărul rezultatelor acceptate	58	54	54	58	58

▼B

Probe	A	B	C	D	E
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Limită de repetabilitate (r) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5
Analit	propan-1-ol

Probe	A	B	C
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	20	22	22
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	4	4	6
Numărul rezultatelor acceptate	40	44	44
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	0,43	0,20	0,43
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Limită de repetabilitate (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5

▼B

Analit 2-metilpropan-1-ol

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	28	31	30	26	25
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	3	0	1	5	6
Numărul rezultatelor acceptate	56	62	60	52	50
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8 (*)	133,87 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Limită de repetabilitate (r) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare 1997
Numărul de laboratoare 32
Numărul de probe 5
Analit 2-metil-butan-1-ol

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	25	26	25	27	25
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	3	2	3	1	2
Numărul rezultatelor acceptate	50	52	50	54	50
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1	39,5
				45,2 (*)	61,5 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Limită de repetabilitate (r) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8

▼B

Probe	A	B	C	D	E
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

Anul testului interlaboratoare	1997
Numărul de laboratoare	32
Numărul de probe	5
Analit	3-metil-butan-1-ol

Probe	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor aberante	23	23	24	27	21
Numărul rezultatelor aberante (laboratoare)	5	5	4	1	6
Numărul rezultatelor acceptate	46	46	48	54	42
Valoarea medie ($\bar{n}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Deviație standard de repetabilitate (S_r) µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Deviația standard relativă de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Limită de repetabilitate (r) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Deviația standard relativă de reproductibilitate (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Limita de reproductibilitate (R) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Tipuri de probe
A Brandy: duplicate martor.
B Kirsch: duplicate martor.
C Grappa: duplicate martor.
D Whisky: nivele de divizare (*).
E Rom: nivele de divizare (*).

▼M1

V. ANETOL. DETERMINAREA TRANS-ANETOLULUI ÎN BĂUTURILE SPIRTOASE PRIN CROMATOGRAFIE ÎN FAZĂ GAZOASĂ

1. Domeniu de aplicare

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea trans-anetolului în băuturile spirtoase cu aromă de anason prin cromatografie capilară în fază gazoasă.

2. Referințe normative

ISO 3696: 1987 Apă pentru utilizare analitică de laborator – Caracteristici și metode de testare.

3. Principiu

Concentrația în trans-anetol a băuturii spirtoase se determină prin cromatografie în fază gazoasă (GC). După adăugarea aceleiași cantități de etalon intern, de exemplu 4-alilanisol (estragol), când estragolul nu este prezent în mod natural în eșantion, eșantionul de testare, pe de o parte, și soluția de referință conținând trans-anetol de concentrație cunoscută, pe de altă parte, ambele se diluează apoi cu ajutorul unei soluții de etanol de 45 % și se injectează direct în cromatograf. Este necesară o extracție înainte de prepararea și analiza eșantionului pentru băuturile spirtoase cu o concentrație mare în glucide.

4. Reactivi și materiale

În cursul analizei, se utilizează exclusiv reactivi de o puritate de minimum 98 % și apă din minimum clasa 3, în conformitate cu definiția standardului ISO 3696.

Substanțele de referință trebuie păstrate la rece (aproximativ 4 °C), la adăpost de lumină, în recipiente de aluminiu sau flacoane speciale din sticlă colorată (brună) pentru reactivi. Dopurile trebuie prevăzute, de preferință, cu un dispozitiv de etanșare din aluminiu. Trans-anetolul trebuie „decongelat” din starea sa cristalină înainte de utilizare, dar în nici un caz temperatura sa nu trebuie să depășească 35 °C.

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

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

4.3. Etalon intern propus: 4-alilanisol, (estragol) (CAS 140-67-0)

4.4. Etanol de 45 % vol.

Se adaugă 560 g de apă distilată la 378 g de etanol de 96 % vol.

4.5. Prepararea soluțiilor etalon

Toate soluțiile etalon trebuie păstrate la temperatura camerei (15-35 ° C), la adăpost de lumină, în recipiente de aluminiu sau flacoane din sticlă colorată (brună) pentru reactivi. Dopurile trebuie prevăzute, de preferință, cu un dispozitiv de etanșare din aluminiu.

Trans-anetolul și 4-alilanisolul sunt practic insolubile în apă, de aceea este necesar să fie dizolvate în puțin etanol de 96 % (punctul 4.1) înainte de adăugarea etanolului de 45 % (punctul 4.4).

Soluțiile-mamă trebuie reînnoite săptămânal.

4.5.1. Soluția etalon A

Soluție-mamă de trans-anetol (concentrație: 2 g/l)

Se cântăresc 40 mg de trans-anetol (punctul 4.2) într-un balon gradat de 20 ml (sau 400 mg în 200 ml etc.). Se adaugă puțin etanol de 96 % (punctul 4.1) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

4.5.2. Soluția etalon intern B

Soluție-mamă de etalon intern, de exemplu de estragol (concentrație: 2 g/l)

▼M1

Se cântăresc 40 mg de estragol (vezi punctul 4.3) într-un balon gradat de 20 ml (sau 400 mg în 200 ml etc.). Se adaugă puțin etanol de 96 % (punctul 4.1) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

4.5.3. Soluții utilizate pentru verificarea liniarității răspunsului detectorului cu ionizare în flacără

Răspunsul privind linearitatea la detectorul cu ionizare în flacără trebuie controlat în vederea analizei pentru o serie de concentrații a trans-anetolului din băuturile spirtoase de la 0 g/l până la 2,5 g/l. În timpul procedurii de analiză, eșantioanele necunoscute de băuturi spirtoase ce trebuie analizate se diluează de 10 ori (punctul 8.3). Pentru condițiile analizei descrise în prezenta metodă, soluțiile-mamă ce corespund unor concentrații de 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 și 0,25 g/l de trans-anetol în eșantionul de analizat se prepară după cum urmează: se prelevează cu ajutorul pipetelor 0,5, 1, 1,5, 2 și 2,5 ml de soluție-mamă A (punctul 4.5.1) și se introduc prelevările în baloane gradate separate de 20 ml. În fiecare balon, se introduc cu o pipetă 2 ml de soluție etalon intern B (punctul 4.5.2) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. Se amestecă bine.

Se utilizează soluția martor (punctul 8.4) ca soluție de 0 g/l.

4.5.4. Soluția etalon C

Se introduc cu pipeta 2 ml de soluție etalon A (punctul 4.5.1) într-un balon gradat de 20 ml, se adaugă 2 ml de soluție etalon intern B (punctul 4.5.2) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

5. **Aparatură și echipamente**

5.1. Cromatograf în fază gazoasă, dotat cu un detector cu ionizare în flacără și cu un integrator sau orice alt sistem de colectare și de gestionare a datelor capabil să măsoare ariile sau înălțimile vârfului și echipat cu un dispozitiv automat de eșantionare sau cu aparatele necesare pentru injectarea manuală a eșantionului.

5.2. Injector divizat/nedivizat

5.3. Coloană cromatografică capilară cu următoarele caracteristici, de exemplu:

lungime: 50 m,

diametru intern: 0,32 mm,

grosimea filmului: 0,2 μm

fază staționară: FFAP – polimer poros reticulat din polietilen glicol modificat cu TPA.

5.4. Materiale de laborator de utilizare curentă: sticlărie gradată de precizie A, balanță de analiză (precizie: ± 0,1 mg).

6. **Condiții de desfășurare a cromatografiei în fază gazoasă**

Tipul și dimensiunile coloanei, precum și condițiile de operare ale cromatografiei în fază gazoasă trebuie să permită separarea anetolului de etalonul intern și de orice altă substanță ce ar putea interveni. Condițiile tipice de lucru pentru coloana prezentată ca exemplu la punctul 5.3 sunt următoarele:

6.1. gaz transportor: heliu analitic

6.2. debit: 2 ml/min

6.3. temperatura injectorului: 250 °C

6.4. temperatura detectorului: 250 °C

6.5. condiții de temperatură ale cuptorului: palier izoterm la 180 °C timp de 10 minute

6.6. volum de injectare: 1 μl, raport 1:40.

▼M1

7. **Eşantioane**

Eşantioanele trebuie păstrate la temperatura camerei, ferite de lumină şi de frig.

8. **Mod de lucru**

8.1. Căutarea prezenţei eventuale a estragolului în eşantion

Pentru a se asigura că eşantionul nu conţine în mod natural estragol, este necesar să se efectueze o analiză martor fără adăugarea vreunui etalon intern. Dacă eşantionul conţine în mod natural estragol, atunci se alege alt etalon intern (de exemplu, mentolul).

Se introduc cu o pipetă 2 ml de eşantion într-un balon gradat de 20 ml şi se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

8.2. Prepararea eşantioanelor necunoscute

Se introduc cu o pipetă 2 ml de eşantion într-un balon gradat de 20 ml, apoi se adaugă 2 ml de soluţie etalon intern B (punctul 4.5.2) şi se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

8.3. Analiză martor

Se introduc cu o pipetă 2 ml de soluţie etalon intern B (punctul 4.5.2) într-un balon gradat de 20 ml şi se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

8.4. Test de linearitate

Înainte de începerea analizei, trebuie verificată linearitatea răspunsului detectorului cu ionizare în flacără, analizând de trei ori succesiv fiecare dintre soluţiile etalon pentru controlarea linearităţii (punctul 4.5.3).

De la ariile sau înălţimile vârfului integratorului, pentru fiecare injectare, se reprezintă grafic concentraţia în g/l a soluţiei-mamă corespunzătoare în funcţie de raportul R.

R = aria sau înălţimea vârfului trans-anetolului împărţită la înălţimea sau aria vârfului estragolului.

Se obţine o reprezentare lineară.

8.5. Determinare

Se injectează soluţia martor (punctul 8.3), apoi soluţia etalon C (punctul 4.5.4), urmată de unul dintre etaloanele de linearitate (punctul 4.5.3) care va servi drept eşantion de control al calităţii (acesta se poate alege cu referire la concentraţia probabilă a trans-anetolului în eşantionul necunoscut), apoi cinci eşantioane necunoscute (punctul 8.2). Pentru a asigura stabilitatea analitică, se introduce un eşantion de control al linearităţii (de control al calităţii) după fiecare serie de cinci eşantioane necunoscute.

9. **Calcularea factorului de răspuns**

Se măsoară ariile vârfului (utilizând un integrator sau alt sistem de colectare şi de gestionare a datelor) sau înălţimile vârfului (integrare manuală) pentru trans-anetol şi pentru etalonul intern.

9.1. Calcularea factorului de răspuns (RF_i)

Factorul de răspuns se calculează în următorul mod:

$RF_i = (C_i/\text{aria sau înălţimea}_i) * (\text{aria sau înălţimea}_{is}/C_{is})$

unde:

C_i este concentraţia trans-anetolului în soluţia etalon A (punctul 4.5.1)

C_{is} este concentraţia etalonului intern în soluţia etalon B

▼M1

(punctul 4.5.2)

$aria_i$ este aria (sau înălțimea) vârfului trans-anetolului

$aria_{is}$ este aria (sau înălțimea) vârfului etalonului intern

Factorul RF_i se calculează din cele cinci eșantioane de soluție C (punctul 4.5.4).

9.2. Analiza soluțiilor de testare a liniarității răspunsului detectorului cu ionizare în flacără

Se injectează soluțiile de testare a liniarității (punctul 4.5.3).

9.3. Analiza eșantionului

Se injectează soluția de eșantion necunoscut (punctul 8.2).

10. **Calcularea rezultatelor**

Formula pentru calcularea concentrației trans-anetolului este următoarea:

$c_i = C_{is} * (\text{aria sau înălțimea}_i/\text{aria sau înălțimea}_{is})*RF_i$

unde

c_i este concentrația necunoscută a trans-anetolului

C_{is} este concentrația etalonului intern în eșantionul necunoscut (punctul 4.5.2)

aria sau înălțimea$_i$ este aria sau înălțimea vârfului trans-anetolului

aria sau înălțimea$_{is}$ este aria sau înălțimea vârfului etalonului intern

RF_i este coeficientul răspunsului (calculat conform punctului 9.1)

Concentrația trans-anetolului se exprimă în grame pe litru, cu o zecimală.

11. **Asigurarea și controlul calității**

Cromatogramele trebuie să prezinte o bună separare a anetolului de etalonul intern, precum și de orice alte substanțe ce ar putea interveni. Valoarea RF_i se calculează din rezultatele celor cinci injecții de soluție C (punctul 4.5.4). În cazul în care coeficientul de variație [CV % = (decalaj standard/medie)*100] se încadrează în jurul valorii de 1 %, valoarea medie a factorului RF_i este acceptabilă.

Calculul anterior trebuie utilizat pentru a se calcula concentrația trans-anetolului din eșantionul ales pentru controlul calității dintre soluțiile pentru controlarea liniarității (punctul 4.5.3).

Dacă rezultatele medii calculate pornind de la analiza soluției pentru controlarea liniarității alese ca eșantion intern de control al calității (ICC) se încadrează în jurul valorii de 2,5 % din valoarea lor teoretică, atunci rezultatele obținute pentru eșantioanele necunoscute sunt considerate acceptabile.

12. **Tratarea eșantioanelor de băuturi spirtoase cu un conținut mare de zahăr și a eșantioanelor de lichior înainte de analiza prin cromatografie în fază gazoasă**

Extragerea alcoolului din băuturile spirtoase cu un conținut mare de zahăr pentru a determina concentrația în trans-anetol prin cromatografia capilară în fază gazoasă.

12.1. Principiu

Se prelevează o parte alicotă din eșantionul de lichior, la care se adaugă etalonul intern, la o concentrație similară celei a analitului (trans-anetolul) prezent în lichior. Se adaugă apoi fosfat de sodiu dodecahidrat și sulfat de amoniu anhidru. Amestecul se agită bine

▼M1

și se refrigerează. Se separă două faze, iar faza alcoolică superioară se recuperează. Se prelevează o parte alicotă din această fază alcoolică și se diluează cu o soluție de etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Trebuie menționat că în acest stadiu nu se adaugă nici un etalon intern, deoarece a fost deja adăugat. Soluția obținută se analizează prin cromatografie în fază gazoasă.

12.2. Reactivi și materiale

În cursul extracției, se utilizează exclusiv reactivi de o puritate de minimum 99 %.

12.2.1. Sulfat de amoniu anhidru (CAS 7783-20-2).

12.2.2. Fosfat de sodiu dibazic, dodecahidrat (CAS 10039-32-4).

12.3. Aparatură și echipamente

Baloane conice, baloane de separare, frigider.

12.4. Mod de lucru

12.4.1. Căutarea estragolului în eșantion

Pentru a se asigura că eșantionul nu conține în mod natural estragol, este necesar să se efectueze o prelevare martor (punctul 12.6.2) și să se realizeze analiza acesteia fără a se adăuga vreun etalon intern. Dacă se dovedește că eșantionul conține în mod natural estragol, este necesar să se aleagă alt etalon intern.

12.4.2. Extragerea

Se introduc cu pipeta 5 ml de etanol de 96 % vol. (punctul 4.1) într-un balon conic, apoi se adaugă succesiv 50 mg de etalon intern (punctul 4.3) și 50 ml de eșantion. Se adaugă 12 g de sulfat de amoniu anhidru (punctul 12.2.1) și 8,6 g de fosfat de sodiu dibazic, dodecahidrat (punctul 12.2.2). Se închide balonul conic.

Se agită balonul timp de cel puțin treizeci de minute. Se poate utiliza un dispozitiv de agitare mecanică, dar nu o bară magnetică pentru agitare acoperită cu teflon, deoarece teflonul absoarbe o parte din analit. Trebuie reținut că sărurile adăugate nu se vor dizolva complet.

Balonul închis se pune într-un frigider ($T < 5$ °C), timp de cel puțin două ore.

După aceea, ar trebui să poată fi observate două straturi distincte în fază lichidă și un reziduu solid. Stratul de alcool trebuie să fie limpede; dacă nu este așa, se pune din nou balonul în frigider până se observă o separare netă.

Când stratul de alcool este limpede, se prelevează cu grijă o parte alicotă (10 ml, de exemplu), fără a tulbura stratul apos, apoi se pune într-un flacon de sticlă brună și se închide cu grijă.

12.4.3. Prepararea extractului de eșantion ce trebuie analizat

Se așteaptă până când extractul (punctul 12.4.2) ajunge la temperatura camerei.

Se prelevează 2 ml din stratul de alcool al extractului de eșantion la temperatura camerei, se introduc cu pipeta într-un balon gradat de 20 ml, se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4) și se amestecă bine.

12.5. Determinare

Se urmează modul de lucru prezentat la punctul 8.5.

12.6. Calcularea rezultatelor

Pentru calcularea rezultatelor se utilizează următoarea formulă:

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

unde:

▼M1

m_{is} este masa etalonului intern (punctul 4.3) prelevat (punctul 12.4.2) (în miligrame)

V este volumul eşantionului necunoscut (50 ml)

RF_i este factorul de răspuns (punctul 9.1)

$aria_i$ este aria vârfului trans-anetolului

$aria_{is}$ este aria vârfului etalonului intern

Rezultatele se exprimă în grame pe litru, cu o zecimală.

12.7. Controlul şi asigurarea calităţii

Se urmează modul de lucru prezentat la punctul 11.

13. **Caracteristicile de performanţă ale metodei (precizia)**

Rezultate statistice ale testului interlaboratoare:

Tabelele de mai jos prezintă valorile anetolului.

Datele menţionate provin dintr-un studiu internaţional privind performanţele metodei, realizat conform procedurilor autorizate la nivel internaţional.

Anul testului interlaboratoare	1998
Numărul de laboratoare	16
Numărul de eşantioane	10
Analit	anetol

Pastis:

Eşantioane	A	B	C	D	E	F
Numărul laboratoarelor reţinute după eliminarea rezultatelor excepţionale	15	15	15	13	16	16
Numărul rezultatelor excepţionale (laboratoare)	1	1	1	3	–	–
Numărul rezultatelor acceptate	30	30	30	26	16	16
Valoare medie g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Decalaj standard de repetabilitate (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	–	–
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	–	–
Limită de repetabilitate (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	–	–
Decalaj standard de reproductibilitate (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Decalaj standard relativ de reproductibilitate (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limită de reproductibilitate (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Tipuri de eşantioane:

A pastis, duplicate oarbe

B pastis, duplicate oarbe

C pastis, duplicate oarbe

D pastis, duplicate oarbe

E pastis, duplicate unice

F pastis, duplicate unice

▼**M1**

Alte băuturi spirtoase cu aromă de anason:

Eşantioane	G	H	I	J
Numărul laboratoarelor reţinute după eliminarea rezultatelor excepţionale	16	14	14	14
Numărul rezultatelor excepţionale (laboratoare)	–	2	1	1
Numărul rezultatelor acceptate	32	28	28	28
Valoare medie g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Decalaj standard de repetabilitate (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Limită de repetabilitate (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Decalaj standard de reproductibilitate (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limită de reproductibilitate (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Tipuri de eşantioane:

G ouzo, niveluri de ramificare (*)

H anason, duplicate oarbe

I lichior cu aromă de anason, duplicate

J lichior cu aromă de anason, duplicate.

▼M1

VI. ACID GLICIRIZIC. DETERMINAREA ACIDULUI GLICIRIZIC PRIN CROMATOGRAFIE LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ

1. **Domeniu de aplicare**

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea acidului glicirizic în băuturile spirtoase cu aromă de anason prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 prevede că orice băutură spirtoasă cu aromă de anason numită „pastis" trebuie să prezinte un conținut în acid glicirizic cuprins între 0,05 g și 0,5 g per litru.

2. **Referințe normative**

ISO 3696: 1987 Apă pentru utilizare analitică de laborator – Caracteristici și metode de testare.

3. **Principiu**

Concentrația în acid glicirizic se determină utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu detectare UV. Se filtrează o soluție etalon și eșantionul de testare și se injectează separat și direct în sistemul HPLC.

4. **Reactivi și materiale**

În cursul analizei, se folosesc exclusiv reactivi adaptați la cromatografia lichidă, etanol absolut și apă de clasa 3, în conformitate cu definiția din standardul ISO 3696.

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

4.2. Glicirizinat de amoniu $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (Sare de acid glicirizic monoamoniacal)

(Masă molară: 839,98) (CAS 53956-04-0): puritate de minimum 90 %

(Masă molară a acidului glicirizic: 822,94)

4.3. Acid acetic cristalizabil, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

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

4.5. Etanol de 50 % vol.

Pentru 1 000 ml la 20 °C:

— etanol de 96 % vol. (punctul 4.1): 521 ml

— apă (punctul 2.0): 511 ml.

4.6. Prepararea soluțiilor de eluare pentru cromatografie lichidă de înaltă performanță

4.6.1. Solvent de eluare A (exemplu)

80 de părți (volume) de apă (punctul 2.0)

20 de părți (volume) de acid acetic (punctul 4.3).

Se degazează solventul de eluare timp de cinci minute.

Notă: dacă apa care se utilizează nu a fost microfiltrată, se recomandă filtrarea solventului de eluare preparat cu ajutorul unui filtru pentru solvenți organici cu un diametru al porilor mai mic sau egal cu 0,45 μm.

4.6.2. Solvent de eluare B

Metanol (punctul 4.4)

4.7. Prepararea soluțiilor etalon

Toate soluțiile etalon trebuie reînnoite la fiecare două luni.

4.7.1. Soluția de referință C

Se cântăresc, cu o eroare de maximum 0,1 mg, 25 mg de glicirizinat de amoniu (punctul 4.2) într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă

▼M1

etanol de 50 % vol. (punctul 4.5) și se dizolvă glicirizinatul de amoniu. După dizolvare, se completează până la semn cu o nouă cantitate de etanol de 50 % vol. (punctul 4.5).

Se filtrează cu ajutorul unui filtru pentru solvenți organici.

4.7.2. Soluții etalon (folosite pentru a controla linearitatea răspunsului instrumentelor)

Se prepară o soluție-mamă de 1,0 g/l introducând, cu o eroare de maximum 0,1 mg, 100 mg de glicirizinat de amoniu într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă puțin etanol de 50 % vol. (punctul 4.5) și se dizolvă glicirizinatul de amoniu. După dizolvare, se completează până la semn cu o nouă cantitate de etanol de 50 % vol. (punctul 4.5).

Se prepară cel puțin alte patru soluții ce corespund la 0,05, 0,1, 0,25 și 0,5 g/l de glicirizinat de amoniu, prelevând cu ajutorul unei pipete respectiv 5 ml, 10 ml, 25 ml și 50 ml din soluția-mamă de 1,0 g/l în baloane gradate separate de 100 ml. Se completează apoi până la semn cu o nouă cantitate de etanol de 50 % vol. (punctul 4.5) și se amestecă bine.

Se filtrează toate soluțiile cu ajutorul unui filtru pentru solvenți organici.

5. **Aparatură și echipamente**

5.1. Sistem de separare

5.1.1. Cromatografie lichidă de înaltă performanță

5.1.2. Sistem de pompare ce permite obținerea și menținerea unui debit constant sau programat de înaltă precizie

5.1.3. Sistem de detectare prin spectrofotometrie în domeniul UV: se reglează la 254 nm

5.1.4. Sistem de degazare a solvenților

5.2. Integrator computerizat sau înregistrator ce funcționează în deplină compatibilitate cu restul sistemului

5.3. Coloană (exemplu):

material: oțel inoxidabil sau sticlă

diametru interior: 4-5 mm

lungime: 100-250 mm

fază staționară: silicagel reticulat cu grup funcțional octadecil (C18), de preferință sferic, cu o granulometrie maximă de 5 μm

5.4. Echipament de laborator

5.4.1. Balanță de analiză (precizie: 0,1 mg)

5.4.2. Sticlărie gradată de precizie (clasa A)

5.4.3. Dispozitiv de filtrare pentru volume mici pe micromembrană

6. **Condiții ale cromatografiei**

6.1. Caracteristicile eluării (exemplu):

— debit: 1 ml/minut;

— solvent A = 30 %;

— solvent B = 70 %.

6.2. Detectare:

— UV = 254 nm.

▼M1

7. **Mod de lucru**

7.1. Prepararea eşantionului de băutură spirtoasă

Se filtrează, dacă este necesar, printr-un filtru pentru solvenţi organici (diametrul porilor: 0,45 μm).

7.2. Determinare

După stabilizarea condiţiilor cromatografice:

— se injectează 20 μl de soluţie de referinţă C (punctul 4.7.1)

— se injectează 20 μl de soluţie de eşantion

— se compară cele două cromatograme. Se identifică vârfurile acidului glicirizic după timpul lor de retenţie. Se măsoară ariile (sau înălţimile) lor şi se calculează concentraţia în g/l, până la două zecimale, folosind următoarea ecuaţie:

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

unde:

c este concentraţia în g/l a acidului glicirizic în băutura spirtoasă analizată

C este concentraţia în g/l a glicirizinatului de amoniu în soluţia de referinţă

h este aria (sau înălţimea) vârfului acidului glicirizic din băutura spirtoasă analizată

H este aria (sau înălţimea) vârfului acidului glicirizic din soluţia de referinţă

P este puritatea glicirizinatului de amoniu utilizat ca substanţă de referinţă (în %)

823 este masa molară a acidului glicirizic

840 este masa molară a glicirizinatului de amoniu

8. **Caracteristicile de performanţă ale metodei (precizia)**

Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Tabelul de mai jos prezintă valorile acidului glicirizic.

Datele menţionate provin dintr-un studiu internaţional privind performanţele metodei, realizat conform procedurilor autorizate la nivel internaţional.

Anul testului interlaboratoare:	1998
Numărul de laboratoare:	16
Numărul de eşantioane:	5
Analit:	acid glicirizic

Eşantioane	A	B	C	D	F
Numărul laboratoarelor reţinute după eliminarea rezultatelor excepţionale	13	14	15	16	16
Numărul rezultatelor excepţionale (laboratoare)	3	2	1	–	–
Numărul rezultatelor acceptate	26	28	30	32	32

▼**M1**

Eșantioane	A	B	C	D	F
Valoare medie g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Decalaj standard de repetabilitate (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Limită de repetabilitate (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Decalaj standard de reproductibilitate (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Decalaj standard relativ de reproductibilitate (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Limită de reproductibilitate (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Tipuri de eșantioane:

A pastis, duplicate oarbe

B pastis, duplicate, la două niveluri de concentrare (*)

C pastis, duplicate oarbe

D pastis, duplicate oarbe

E pastis, duplicate oarbe

▼M1

VII. CALCONE. METODĂ DE CROMATOGRAFIE LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ PENTRU A VERIFICA PREZENȚA CALCONELOR ÎN PASTIS

1. **Domeniu de aplicare**

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea prezenței calconelor în băuturile cu aromă de anason. Calconele sunt coloranți naturali din familia flavonoidelor, prezenți în lemnul dulce (*Glycyrrhiza glabra*).

Pentru ca o băutură spirtoasă cu aromă de anason să se numească „pastis", aceasta trebuie să conțină calcone [Regulamentul (CEE) nr. 1576/89].

2. **Referințe normative**

ISO 3696: 1987 Apă pentru utilizare analitică de laborator – Caracteristici și metode de testare.

3. **Principiu**

Se prepară o soluție de extract de lemn dulce de referință. Prezența sau absența calconelor se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu detectare UV.

4. **Reactivi și materiale**

În cursul analizei, se folosesc doar reactivi adaptați la cromatografia lichidă de înaltă performanță. Etanolul trebuie să fie de 96 % vol. Trebuie să se folosească doar apă de clasa 3 (în conformitate cu definiția din norma ISO 3696).

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

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

4.3. Substanță de referință: *Glycyrrhiza glabra* (lemn dulce)

Lemn dulce (*Glycyrrhiza glabra*) măcinat mare. Dimensiuni medii ale particulelor de tip „batonașe": lungimea 10-15 mm, grosimea 1-3 mm.

4.4. Acetat de sodiu CH_3COONa, (CAS 127-09-3)

4.5. Acid acetic cristalizabil CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.6. Prepararea soluțiilor

4.6.1. Etanol de 50 % vol.

Pentru 1 000 ml la 20 °C:

— etanol de 96 % vol. (punctul 4.1): 521 ml

— apă (punctul 2.0): 511 ml.

4.6.2. Solventul A: acetonitril

Acetonitril (punctul 4.2) de puritate analitică pentru HPLC.

Se degazează

4.6.3. Solventul B: 0,1 M dintr-o soluție tampon de acetat de sodiu cu pH de 4,66

Se cântăresc 8,203 g de acetat de sodiu (punctul 4.4), se adaugă 6,005 g de acid acetic cristalizabil (punctul 4.5) și se completează până la 1 000 ml cu apă (punctul 2) într-un balon gradat.

5. **Prepararea extractului de referință din *Glycyrrhiza glabra* (punctul 4.3)**

5.1. Se cântăresc 10 g de lemn dulce măcinat (*Glycyrrhiza glabra*) (punctul 4.3) și se pun într-un balon de distilare cu fund rotund.

— Se adaugă 100 ml de etanol de 50 % vol. (punctul 4.6.1)

— Se distilează sub reflux timp de o oră

— Se filtrează

▼M1

— Se rezervă filtratul pentru o utilizare ulterioară.

5.2. Se recuperează extractul de lemn dulce prezent în filtru.

— Se pune într-un balon de distilare cu fund rotund

— Se adaugă 100 ml de etanol de 50 % vol. (punctul 4.6.1)

— Se fierbe sub reflux pentru o oră

— Se filtrează. Se păstrează filtratul pentru o utilizare ulterioară.

5.3. Extragerea de lemn dulce trebuie să se efectueze de trei ori succesiv.

5.4. Se combină cele trei filtrate.

5.5. Se evaporă faza solvent (punctul 5.4) cu ajutorul unui evaporator de tip rotativ.

5.6. Se recuperează extractul rezidual (punctul 5.5) cu 100 ml de etanol de 50 % vol. (punctul 4.6.1).

6. **Aparatură și echipamente**

6.1. Sistem de separare

6.1.1. Cromatografie lichidă de înaltă performanță

6.1.2. Sistem de pompare ce permite obținerea și menținerea unui debit constant sau programat la înaltă presiune

6.1.3. Sistem de detectare prin spectrofotometrie în domeniul UV/vizibil care se poate regla la 254 nm și 370 nm

6.1.4. Sistem de degazare a solvenților

6.1.5. Cuptor în coloană cu temperatura reglată la 40 °C ± 0,1 °C

6.2. Integrator computerizat sau înregistrator ce funcționează în compatibilitate cu restul sistemului de separare

6.3. Coloana:

material: oțel inoxidabil sau sticlă

diametru interior: 4-5 mm

fază staționară: silicagel reticulat cu grupare funcțională de tip derivat octadecil (C18), cu o granulometrie maximă de 5 μm (faza reticulată).

6.4. Echipament obișnuit de laborator, mai ales:

6.4.1. balanță de analiză (precizie: ± 0,1 mg)

6.4.2. aparat de distilare echipat cu un condensator cu reflux ce cuprinde, de exemplu:

— un balon de 250 ml cu fund rotund cu îmbinare șlefuită standardizată

— un condensator cu reflux de o lungime de 30 cm

— o sursă de căldură (orice pirogenare a materiilor extractive trebuie evitată cu ajutorul unui dispozitiv corespunzător)

6.4.3. Aparat de evaporare de tip rotativ

6.4.4. Dispozitiv de filtrare (pâlnie Buchner, de exemplu)

6.5. Condiții ale cromatografiei (exemplu)

6.5.1. Caracteristici de eluare a solvenților A (punctul 4.6.2) și B (punctul 4.6.3):

— se trece de la gradientul 20/80 (v/v) la 50/50 (v/v) în 15 minute

— se trece de la gradientul 50/50 (v/v) la 75/25 (v/v) în 5 minute

— tărie egală la 75/25 (v/v) timp de 5 minute

— stabilizare a coloanei între două injectări

— tărie egală la 20/80 (v/v) timp de 5 minute.

▼M1

6.5.2. Debit: 1 ml/minut

6.5.3. Reglări ale detectorului cu UV

Detectorul trebuie reglat la 370 nm pentru a detecta prezența calconelor și apoi la 254 nm pentru a detecta acidul glicirizic.

Notă: schimbarea lungimilor de undă (de la 370 nm la 254 nm) trebuie efectuată cu 30 de minute înainte de începerea vârfului de eluare a acidului glicirizic.

7. **Mod de lucru**

7.1. Prepararea eșantionului de băutură spirtoasă

Se filtrează printr-un filtru pentru solvenți organici (diametrul porilor: 0,45 μm).

7.2. Prepararea extractului rezidual de lemn dulce (punctul 5.6)

Înaintea analizei, se procedează la o diluare de 1:10 în etanol de 50 % vol. (punctul 4.6.1).

7.3. Determinare

7.3.1. Se injectează 20 μl din extractul de lemn dulce preparat (punctul 7.2). Se efectuează analiza în condițiile cromatografice descrise anterior (punctul 6.5).

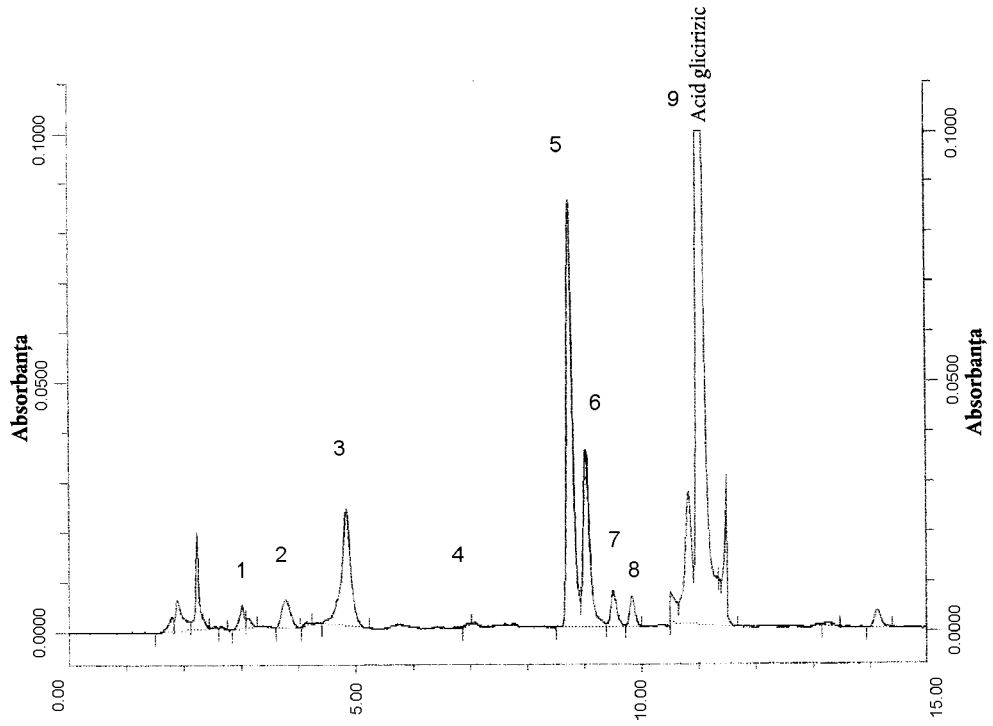
7.3.2. Se injectează 20 μl din eșantion (băutură spirtoasă cu aromă de anason, punctul 7.1). Se efectuează analiza în condițiile cromatografice descrise anterior (punctul 6.5).

7.3.3. Se compară cele două cromatograme obținute. Trebuie să existe o mare asemănare între cele două cromatograme în zona de ieșire a calconelor (în timpul detectării la 370 nm în condițiile de analiză descrise anterior). Vezi figura 1.

8. **Cromatograma caracteristică pentru pastis**

Figura 1

Cromatogramă obținută prin metoda descrisă anterior, indicând prezența calconelor într-un pastis. Vârfurile de la 1 la 8 corespund calconelor, iar vârful 9 acidului glicirizic.



▼M1

9. **Caracteristicile de performanță ale metodei (precizia)**

Rezultatele testului interlaboratoare

Tabelul de mai jos prezintă caracteristicile de performanță pentru identificarea prezenței sau absenței calconelor în pastis și în băuturile spirtoase cu aromă de anason.

Datele menționate provin dintr-un studiu internațional privind performanțele metodei, realizat conform procedurilor autorizate la nivel internațional.

Anul testului interlaboratoare:	1998
Numărul de laboratoare:	14
Numărul de eșantioane:	11
Analit:	calcone

Eșantioane	A	B	C	D	E	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	14	14	14	14	14	13
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	–	–	–	–	–	1 (*)
Numărul rezultatelor acceptate	28	14	14	28	28	26
Numărul rezultatelor atestând prezența calconelor	28	14	14	0	28	0
Numărul rezultatelor atestând absența calconelor	0	0	0	28	0	26
Procentul rezultatelor corecte (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Rezultate incompatibile între cele două duplicate, datorate unei erori de eșantionare.

Eșantioane	G	H	I	J	K
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	14	14	14	14	14
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	–	–	–	–	–
Numărul rezultatelor acceptate	28	14	14	28	28
Numărul rezultatelor atestând prezența calconelor	0	0	0	0	0
Numărul rezultatelor atestând absența calconelor	28	14	14	28	28
Procentul rezultatelor corecte (%)	100	100	100	100	100

Tipuri de eșantioane:

A pastis, duplicate oarbe

B pastis, eșantion unic

C pastis, eșantion unic

D „pastis” (fără calcone), duplicate oarbe

E „pastis” (fără calcone), duplicate oarbe

F lichior cu aromă de anason (fără calcone), duplicate oarbe

G lichior cu aromă de anason (fără calcone), duplicate oarbe

H ouzo, (fără calcone), eșantion unic

▼**M1**

I ouzo, (fără calcone), eșantion unic

J anason (fără calcone), duplicate oarbe

K „pastis” (fără calcone), duplicate oarbe.

▼M1

IX. GĂLBENUȘ DE OU. DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI DE GĂLBENUȘ DE OU DIN BĂUTURILE SPIRTOASE – METODA FOTOMETRICĂ

1. **Domeniu de aplicare**

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea concentrației de gălbenuș de ou de la 40 la 250 g/l în lichiorul de ou și lichiorul pe bază de ou.

2. **Referințe normative**

ISO 3696: 1897 Apă pentru utilizare analitică de laborator – Caracteristici și metode de testare

3. **Principiu**

Compușii fosforoși solubili în etanol prezenți în gălbenușul de ou se extrag și se determină prin fotometrie sub formă de complex fosfomolibdenic.

4. **Reactivi**

4.1. Apă dublu-distilată

4.2. Diatomit

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

4.4. Soluție de acetat de magneziu de 15 % (CAS 16674-78-5)

4.5. Acid sulfuric de 10 % (CAS 7664-93-9)

4.6. Acid sulfuric 1N

4.7. Soluție de fosfat monobazic de potasiu (CAS 778-77-0), KH_2PO_4, de 0,16 g/l

4.8. Reactiv pentru determinarea fosfatului:

se dizolvă 20 g de molibdat de amoniu (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ în 400 ml de apă la 50 °C.

Se dizolvă, în alt recipient, 1 g de vanadat de amoniu (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3, în 300 ml de apă caldă, se lasă să se răcească, apoi se adaugă 140 ml de acid nitric concentrat (CAS 7697-37-2). Se combină soluțiile răcite într-un balon gradat de 1 000 ml și se completează până la gradația de 1 000 ml.

5. **Aparatură și echipamente**

5.1. Balon conic de 100 ml

5.2. Baie ultrasonică (sau agitator magnetic)

5.3. Balon conic de 100 ml

5.4. Baie de apă la 20 °C

5.5. Filtru (Whatman nr. 4 sau echivalent)

5.6. Creuzet de porțelan (sau de platină)

5.7. Baie de apă clocotită

5.8. Placă fierbinte

5.9. Cuptor închis

5.10. Balon gradat de 50 ml

5.11. Balon gradat de 20 ml

5.12. Spectrofotometru reglat la 420 nm

5.13. Cuvă de 1 cm.

6. **Eșantioane**

Eșantioanele se păstrează la temperatura camerei înainte de analiză.

▼M1

7. **Mod de lucru**

7.1. Pregătirea eșantioanelor

7.1.1. Se introduc 10 g de eșantion într-un balon conic de 100 ml (punctul 5.1).

7.1.2. Se adaugă 70 ml de etanol treptat și în cantități mici, amestecând la fiecare adăugare. Amestecul se introduce într-o baie ultrasonică (punctul 5.2) timp de 15 minute [sau se amestecă cu ajutorul unui agitator magnetic (punctul 5.2) timp de 10 minute la temperatura camerei].

7.1.3. Se transferă conținutul balonului într-un balon gradat de 100 ml (punctul 5.3) și se adaugă volume de etanol de spălare (punctul 4.3). Se completează cu etanol (punctul 4.3) până la gradația de etalonare, apoi baloanele se pun într-o baie de apă la 20 °C (punctul 5.4). Se completează până la semnul de etalonare, la temperatura de 20 °C.

7.1.4. Se adaugă o cantitate mică de diatomit (punctul 4.2) și se filtrează (punctul 5.5), eliminând primii 20 ml.

7.1.5. Se transferă 25 ml de filtrat într-un creuzet de porțelan (sau de platină) (punctul 5.6). Filtratul trebuie apoi să se concentreze prin evaporare ușoară într-o baie de apă clocotită (punctul 5.7), după adăugarea a 5 ml de soluție de acetat de magneziu de 15 % (punctul 4.4).

7.1.6. Se așează creuzetele pe o placă fierbinte (punctul 5.8) și se încălzesc până sunt aproape uscate.

7.1.7. Se calcinează reziduul uscat încălzindu-l până la incandescență, la 600 °C, într-un cuptor închis (punctul 5.9) până se obține o cenușă albă. Operațiunea durează cel puțin o oră și jumătate, dar se poate prelungi toată noaptea.

7.1.8. Se recuperează cenușa cu ajutorul a 10 ml de acid sulfuric de 10 % (punctul 4.5) și se transferă cu ajutorul spălărilor de apă distilată (punctul 4.1) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 5.10). Conținutul se completează cu apă distilată până la semn, la temperatura camerei. Se rezervă o parte alicotă de 5 ml din această soluție de cenușă pentru prepararea soluției de eșantion ce se utilizează pentru testarea fotometrică a fosfaților.

7.2. Testare fotometrică a fosfaților

7.2.1. Soluție comparativă

7.2.1.1. Se introduc 10 ml de acid sulfuric de 10 % (punctul 4.5) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 5.10) și se completează până la semn cu apă distilată (punctul 4.1).

7.2.1.2. Într-un balon gradat de 20 ml (punctul 5.11), se introduce o parte alicotă de 5 ml din această soluție (punctul 7.2.1.1), apoi se adaugă 1 ml de acid sulfuric de 1 N (punctul 4.6) și 2 ml de reactiv la fosfat (punctul 4.8). Se completează până la un volum de 20 ml cu apă distilată (punctul 4.1).

7.2.1.3. Se închide, fără a fixa ermetic dopul, se agită și se încălzește într-o baie de apă clocotită (punctul 5.7) timp de 10 minute, apoi se lasă să se răcească într-o baie de apă (punctul 5.4) la 20 °C timp de 20 de minute.

7.2.1.4. Se varsă această soluție comparativă într-o cuvă de 1 cm (punctul 5.13).

7.2.2. Soluție de eșantion

7.2.2.1. Într-un balon gradat de 20 ml (punctul 5.11), se introduce o parte alicotă de 5 ml din soluția de cenușă (punctul 7.1.8), apoi se adaugă 1 ml de acid sulfuric de 1 N (punctul 4.6) și 2 ml de reactiv la fosfat (punctul 4.8). Se completează până la un volum de 20 ml cu apă distilată (punctul 4.1).

7.2.2.2. Se închide, fără a fixa ermetic dopul, se agită și se încălzește într-o baie de apă clocotită (punctul 5.7) timp de 10 minute, apoi se lasă să se răcească într-o baie de apă (punctul 5.4) la 20 °C timp de 20 de minute.

▼M1

7.2.2.3. Soluția galbenă care se formează se analizează imediat spectrofotometric (punctul 5.12) într-o cuvă de 1 cm (punctul 5.13) la 420 nm în raport cu soluția comparativă (punctul 7.2.1.4).

7.2.3. Curba de etalonare

7.2.3.1. Pentru a stabili curba de etalonare, se adaugă părți alicote de 2 ml de reactiv la fosfat (punctul 4.8) în baloane gradate de 20 ml (punctul 5.11) care conțin fiecare 1 ml de acid sulfuric 1 N (punctul 4.6) și, respectiv, 0, 2, 4, 6, 8 și 10 ml de soluție de fosfat monobazic de potasiu (punctul 4.7) și se completează până la gradația de 20 ml cu apă distilată (punctul 4.1).

7.2.3.2. Se închide, fără a fixa ermetic dopul, se agită și se încălzește într-o baie de apă clocotită (punctul 5.7) timp de 10 minute, apoi se lasă să se răcească într-o baie de apă (punctul 5.4) la 20 °C timp de 20 de minute și se analizează spectrofotometric la 420 nm (punctul 5.12), într-o cuvă de 1 cm (punctul 5.13), în raport cu soluția comparativă (punctul 7.2.1.4).

7.2.3.3. Stabilirea curbei de etalonare

Soluție de fosfat monobazic (ml)	0	2	4	6	8	10
P_2O_5 (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. **Exprimarea rezultatelor**

Conținutul în gălbenuș de ou, exprimat în g/l, se calculează după următoarea formulă:

$$\text{g/lgălbenușdeou} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{densitate}}{E/40}$$

unde:

110	este factorul de conversie pentru cantitatea totală de P_2O_5 în g din 100 g de gălbenuș de ou
mg P_2O_5	este valoare determinată de curba de etalonare
densitate	este masa per unitate de volum (g/ml) de lichior de ou la temperatura de 20 °C
E	este masa lichiorului de ou în g
40	este factorul de diluare pentru o porțiune de 5 ml de soluție de cenușă.

9. **Caracteristicile de performanță ale metodei (precizia)**

Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Tabelul de mai jos oferă valorile pentru gălbenușul de ou.

Datele menționate provin dintr-un studiu internațional privind performanțele metodei, realizat conform procedurilor autorizate la nivel internațional.

Anul testului interlaboratoare:	1998
Numărul de laboratoare:	24
Numărul de eșantioane:	5
Analit:	gălbenușul de ou

Eșantioane	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	19	20	22	20	22

▼M1

Eşantioane	A	B	C	D	E
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	3	4	2	4	2
Numărul rezultatelor acceptate	38	40	44	40	44
Valoare medie	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Decalaj standard de repetabilitate (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Limită de repetabilitate (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Decalaj standard de reproductibilitate (S_R) (%)	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Decalaj standard relativ de reproductibilitate (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Limită de reproductibilitate (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Tipuri de eşantioane:

A Advocaat, duplicate oarbe

B Advocaat, duplicate oarbe

C Advocaat, duplicate oarbe

D Advocaat (diluat), niveluri de ramificare (*)

E Advocaat, duplicate oarbe