Tento dokument slúži čisto na potrebu dokumentácie a inštitúcie nenesú nijakú zodpovednosť za jeho obsah

►**B**

NARIADENIE KOMISIE č. 2870/2000

z 19. decembra 2000,

ktorým sa stanovujú referenčné metódy analýzy liehovín v spoločenstve

(UL L 333, 29.12.2000, str. 20)

Zmenené a doplnené:

		Úradný vestník		
		Č.	Strana	Dátum
►**M1**	Nariadenie Komisie (ES) č. 2091/2002 z 26. novembra 2002	L 322	11	27.11.2002

▼B

NARIADENIE KOMISIE č. 2870/2000

z 19. decembra 2000,

ktorým sa stanovujú referenčné metódy analýzy liehovín v spoločenstve

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na nariadenie Rady (EHS) č. 1576/89 z 29. mája 1989, ktorým sa stanovujú všeobecné pravidlá pre definíciu, popis a prezentáciu liehovín ([1]), naposledy zmenené a doplnené Aktom o pristúpení Rakúska, Fínska a Švédska, najmä na jeho článok 4 (8),

keďže:

(1) Článok 4 (8) nariadenia (EHS) č. 1576/89 z 29. mája 1989 stanovuje prijať metódy, ktoré sa majú používať pri analýze liehovín. Pri každej úradnej kontrole a v spornom prípade by sa mali používať referenčné metódy, ktorými sa má zabezpečiť súlad s nariadením (EHS) č. 1576/89 a nariadením Komisie (EHS) č. 1014/90 z 24. apríla 1990, ktorým sa stanovujú podrobné vykonávacie pravidlá pre definíciu, popis a prezentáciu liehovín ([2]) a ktoré bolo naposledy zmenené a doplnené nariadením (ES) č. 2140/98 ([3]).

(2) Pokiaľ je to možné, bolo by užitočné prijať všeobecne uznávané metódy a popísať ich ako analytické referenčné metódy spoločenstva.

(3) Kvôli zohľadneniu pokrokov vedy a rozdielov vo vybavení úradných laboratórií by malo byť používanie metód založených na iných princípoch merania než referenčné metódy, ktoré sú popísané v prílohe k tomuto nariadeniu, povolené na zodpovednosť vedúceho laboratória v tých prípadoch, keď tieto metódy dávajú primeranú záruku, pokiaľ ide o výsledky, a najmä spĺňajú kritériá stanovené v prílohe k smernici Rady 85/591/EHS z 20. decembra 1985, ktorá sa týka zavedenia vzorkovacích a analytických metód v spoločenstve na sledovanie potravín určených pre ľudskú výživu ([4]) a ak je možné preukázať, že presnosť, opakovateľnosť a reprodukovateľnosť výsledkov získaných týmito metódami je v rámci limitov presnosti, opakovateľnosti a reprodukovateľnosti výsledkov získaných použitím referenčných metód popísaných v tomto nariadení. Ak je táto podmienka splnená, malo by sa používanie iných analytických metód povoliť. Je však dôležité stanoviť, že v sporných prípadoch nemôžu byť referenčné metódy nahradené inými metódami.

(4) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Výkonného výboru pre liehoviny,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Referenčnými metódami spoločenstva na analýzu liehovín, ktorými sa má zabezpečiť súlad s nariadením (EHS) č. 1576/89 a nariadením (EHS) č. 1014/90:

([1]) Ú. v. ES L 160, 12.6.1989, s. 1.
([2]) Ú. v. ES L 105, 25.4.1990, s. 9.
([3]) Ú. v. ES L 270, 7.10.1998, s. 9.
([4]) Ú. v. ES L 372, 31.12.1985, s. 50.

▼B

— pri každej úradnej kontrole alebo

— v spornom prípade,

sú tie metódy, ktoré sú stanovené v prílohe k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Bez ohľadu na prvú zarážku článku 1 je povolené používať iné analytické metódy na zodpovednosť vedúceho laboratória s podmienkou, že správnosť a presnosť (opakovateľnosť a reprodukovateľnosť) výsledkov týchto metód je aspoň rovnocenná s presnosťou a správnosťou výsledkov príslušných analytických metód uvedených v prílohe.

Článok 3

V prípadoch, keď nie sú stanovené analytické referenčné metódy na zisťovanie a kvantifikáciu látok obsiahnutých v konkrétnej liehovine, použijú sa tieto metódy:

a) analytické metódy, ktoré sú schválené medzinárodne uznávanými postupmi a ktoré predovšetkým spĺňajú kritériá stanovené v prílohe k smernici 85/591/EHS;

b) analytické metódy, ktoré vyhovujú odporúčaným normám Medzinárodnej organizácie pre normalizáciu (ISO);

c) analytické metódy, ktoré uznáva a uverejňuje Valné zhromaždenie Medzinárodného úradu pre vínnu révu a vína (OIV);

d) ak neexistuje metóda uvedená v a), b) a c), pokiaľ ide o presnosť, opakovateľnosť a reprodukovateľnosť:

   — analytická metóda, ktorú schválil príslušný členský štát,

   — v prípade potreby ktorákoľvek iná vhodná analytická metóda.

Článok 4

Na účely tohto nariadenia:

a) „limit opakovateľnosti“: je hodnota, pre ktorú je možné s pravdepodobnosťou 95 % očakávať, že absolútna hodnota rozdielu medzi dvoma výsledkami skúšok získanými za podmienok opakovateľnosti (ten istý obslužný pracovník, ten istý prístroj, to isté laboratórium a krátky časový interval) je menšia alebo rovná tejto hodnote {ISO 3534-1};

b) „limit reprodukovateľnosti“: je hodnota, pre ktorú je možné s pravdepodobnosťou 95 % očakávať, že absolútna hodnota rozdielu medzi dvoma výsledkami skúšok získanými za podmienok v podmienkach reprodukovateľnosti (rôzni obslužní pracovníci, rôzne prístroje a rôzne laboratóriá) je menšia alebo rovná tejto hodnote {ISO 3534-1};

c) „správnosť“: je blízkosť zhody medzi výsledkom skúšky a prijatou referenčnou hodnotou {ISO 3534-1}.

Článok 5

Toto nariadenie nadobudne účinnosť siedmy deň odo dňa jeho uverejnenia v *Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev*.

Bude sa uplatňovať od 1. januára 2001.

Toto nariadenie je záväzné vo svojej celistvosti a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

▼B

PRÍLOHA

POPIS ANALYTICKÝCH REFERENČNÝCH METÓD

I. Príloha I: Príprava destilátu

Príloha II: Meranie hustoty destilátu

— Metóda A = piknometria

— Metóda B = elektronické meranie hustoty

— Metóda C = meranie hustoty pomocou hydrostatických váh

II. Stanovenie celkovej sušiny gravimetrickým meraním

III. Stanovenie prchavých látok a metanolu

III.1 Všeobecné poznámky

III.2 Prchavé spoluvznikajúce zložky (kogenery): aldehydy, vyššie alkoholy, etylacetát a metanol (plynovou chromatografiou)

III.3 Prchavé kyseliny (p.m.)

IV. Kyselina kyanovodíková (p.m.)

V. Anetol ►M1 ——————— ◄

VI. Kyselina glycyrrhizová ►M1 ——————— ◄

VII. Chlakóny ►M1 ——————— ◄

VIII. Celkový cukor (p.m.)

IX. Vaječný žĺtok ►M1 ——————— ◄

▼B

I STANOVENIE OBSAHU ETANOLU V LIEHOVINÁCH V OBJEMOVÝCH PERCENTÁCH ALKOHOLU

Úvod

Popis referenčnej metódy obsahuje dve prílohy:

Príloha I: Príprava destilátu

Príloha II: Meranie hustoty destilátu

1. **Zameranie**

Táto metóda je vhodná na určovanie skutočného obsahu etanolu v liehovinách v objemových percentách alkoholu.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696:1987: Voda pre analytické laboratórne využitie – Technické údaje a skúšobné metódy

3. **Pojmy a definície**

3.1. Referenčná teplota:

Referenčná teplota pre stanovenie obsahu etanolu na základe objemu, hustoty a mernej tiaže je 20 °C.

Poznámka 1 Pojem „pri t C“ je vyhradený pre všetky prípady, keď sú určované hodnoty (hustota alebo obsah etanolu v objemových percentách alkoholu) vyjadrené pri teplote rôznej od referenčnej teploty 20 °C.

3.2. Hustota:

Hustota je hmotnosť na jednotku objemu liehovín vo vákuu pri 20 °C. Vyjadruje sa v kilogramoch na meter kubický a jej symbol je $\rho_{20°C}$ alebo ρ_{20}.

3.3. Merná tiaž:

Merná tiaž je pomer hustoty liehovín pri 20 °C k hustote vody pri tej istej teplote vyjadrený ako desatinné číslo. Označuje sa symbolom $d_{20°C/20°C}$ alebo $d_{20/20}$, alebo jednoducho d, ak neexistuje žiadna možnosť zámeny. Charakteristika, ktorá bola nameraná, sa musí uviesť v protokole zo skúšky iba pomocou vyššie definovaných symbolov.

Poznámka 2: Hodnotu mernej tiaže je možné získať z hustoty ρ_{20} pri 20° C:

ρ_{20} = 998,203 x $d_{20/20}$alebo $d_{20/20} = \rho_{20}/998{,}203$

kde 998,203 je hustota vody pri 20 °C.

3.4. Skutočný obsah etanolu v liehovinách v objemových percentách alkoholu:

Skutočný obsah etanolu v liehovinách v objemových percentách alkoholu sa rovná počtu litrov etylalkoholu obsiahnutých v 100 l zmesi vody a alkoholu, ktorá má rovnakú hustotu ako alkohol alebo lieh po destilácii. Referenčné hodnoty obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu (obj.) pri 20 °C v závislosti od hustoty pri 20 C pre rôzne zloženia zmesi vody a alkoholu, ktoré sa majú používať, sú uvedené v medzinárodnej tabuľke, ktorú prijala Medzinárodná organizácia legálnej metrológie vo svojom Odporúčaní č. 22.

Všeobecná rovnica týkajúca sa obsahu etanolu v liehovinách v objemových percentách alkoholu a hustoty zmesi vody a alkoholu pri danej teplote je uvedená na strane 40 v kapitole 3 „Obsah etanolu v liehovinách v objemových percentách alkoholu“ prílohy k nariadeniu Komisie (EHS) č. 2676/90 (Ú. v. ES L 272, 3.10.1990, s. 1) alebo v príručke analytických metód OIV (1994) (s. 17).

Poznámka 3: V prípade likérov a krémových likérov, u ktorých je veľmi ťažké presne merať objem, sa musí vzorka odvážiť a najprv sa vypočíta obsah etanolu v hmotnostných percentách alkoholu.

▼B

Prevodový vzorec:

$$\text{obsah etanolu v liehovine v objemových percentách alkoholu (\% obj.)} = \frac{\text{ASM (\% hmotn.) x (vzorka)}}{\text{(alkohol)}}$$

kde

ASM = obsah etanolu v hmotnostných percentách

ρ_{20} (alkohol) = 789,24 kg/m^3

4. **Princíp**

Po destilácii sa určí obsah etanolu v destiláte v objemových percentách alkoholu piknometrickým meraním, elektronickým meraním hustoty alebo meraním hustoty pomocou hydrostatických váh.

▼B

PRÍLOHA I: PRÍPRAVA DESTILÁTU

1. **Zameranie**

Táto metóda je vhodná na prípravu destilátov, ktoré sa používajú pri určovaní skutočného obsahu etanolu v liehovinách v objemových percentách alkoholu.

2. **Princíp**

Liehoviny sa destilujú, aby sa oddelil etylalkohol a iné prchavé zlúčeniny od extrahovateľných látok (látky, ktoré sa nedestilujú).

3. **Reagenty a materiály**

3.1. Granule proti búrlivému varu.

3.2. Koncentrovaná protipenová emulzia (pre krémové likéry).

4. **Prístroje a vybavenie**

Obvyklé laboratórne prístroje, najmä tie, ktoré sú uvedené ďalej.

4.1. Vodný kúpeľ, ktorý je možné udržiavať na teplote 10 °C až 15 °C.

Vodný kúpeľ, ktorý je možné udržiavať na teplote 20 °C (± 0,2 °C).

4.2. Odmerné banky triedy A, s objemom 100 ml a 200 ml, ktoré boli úradne ciachované na 0,1 a 0,15.

4.3. Destilačný prístroj:

4.3.1. Všeobecné požiadavky

Destilačný prístroj musí spĺňať tieto technické požiadavky:

— počet spojov nesmie byť vyšší než prísne minimálne množstvo potrebné na zabezpečenie tesnosti systému,

— do prístroja musí byť zapojené zariadenie určené na zabránenie prenikaniu (strhávaniu vriacej kvapaliny parami) a zrovnomernenie destilačnej rýchlosti pár s vysokým obsahom alkoholu,

— rýchla a úplná kondenzácia alkoholových pár,

— prvé destilačné frakcie sa musia zachytávať vo vodnom prostredí.

Musí sa používať tepelný zdroj vybavený vhodným tepelným difúzorom, ktorý úplne zabráni možným pyrolytickým reakciám pri kontakte s extrahovateľnými látkami.

4.3.2. Príklad vhodného destilačného prístroja je znázornený na obrázku 1. Prístroj sa skladá z týchto častí:

— banka so zaobleným dnom, 1 liter, s normalizovaným zabrúseným skleným spojom,

— rektifikačná kolóna vysoká aspoň 20 cm (napríklad Vigreuxova kolóna),

— kolenová spojovacia trubka s približne 10 cm dlhým vodorovne osadeným kondenzátorom s priamym okrajom (kondenzátor typu West), nasadená vertikálne,

— 40 cm dlhá chladiaca špirála,

— odvodná trubka, ktorou sa destilát privádza ku dnu ociachovanej zbernej odmerky obsahujúcej malé množstvo vody.

Poznámka: Vyššie popísaný prístroj je určený na prácu so vzorkou s objemom najmenej 200 ml. Možno ním však destilovať aj vzorky s menším objemom (100 ml) pomocou menšej destilačnej banky za predpokladu, že sa použije rozstrekovacia hlava alebo nejaké iné zariadenie, ktorým sa zabráni strhávaniu vriacej kvapaliny parami.

5. **Skladovanie skúšobných vzoriek**

Vzorky sa pred analýzou skladujú pri izbovej teplote.

6. **Postup**

Predbežná poznámka:

▼B

Destiláciu je možné vykonávať aj postupom, ktorý uverejnila IUPAC (1968).

6.1 Overenie destilačného prístroja.

Použitý prístroj musí byť schopný vykonávať tieto činnosti:

Pri destilácii 200 ml vodného roztoku alkoholu so známou koncentráciou blízkou 50 % obj. nesmú vznikať vyššie straty alkoholu než 0,1 % obj.

6.2 Liehoviny s obsahom etanolu menej než 50 % obj. alkoholu.

Odmerajte pomocou odmernej banky 200 ml liehoviny.

Zaznamenajte si teplotu tejto kvapaliny, alebo ju udržujte pri štandardnej teplote (20 °C).

Vylejte vzorku do banky so zaobleným dnom, ktorá je súčasťou destilačného prístroja a vypláchnite odmernú banku tromi dávkami po približne 20 ml destilovanej vody. Každú dávku výplachovej vody pridajte k obsahu destilačnej banky.

Poznámka: Takéto 60-ml zriedenie je dostatočné pre liehoviny s menším obsahom sušiny než 250 g na liter. V opačnom prípade, aby sa zabránilo pyrolýze, musí byť objem výplachovej vody aspoň 70 ml, ak je koncentrácia sušiny 300 g/l, 85 ml pri 400 g/l sušiny a 100 ml pre 500 g/l sušiny (niektoré ovocné likéry alebo krémové likéry). Upravte tieto objemy úmerne rôznym objemom vzoriek.

Pridajte niekoľko granúl proti búrlivému varu (3.1) (a v prípade krémových likérov aj protipenovú emulziu).

Nalejte 20 ml destilovanej vody do pôvodnej odmernej banky s objemom 200 ml, v ktorej bude uložený destilát. Túto banku potom musíte vložiť do studeného vodného kúpeľa (4.1) (10 až 15 °C pre liehoviny s anízovou príchuťou).

Destilujte, dávajte pozor na to, aby ste zabránili strhávaniu vriacej kvapaliny parami a opaľovaniu a príležitostne premiešajte obsah banky, kým hladina destilátu neklesne niekoľko milimetrov pod kalibračnú značku na odmernej banke.

Keď teplota tohto destilátu klesne na hodnotu v rozmedzí 0,5 °C od počiatočnej teploty kvapaliny, dolejte destilovanú vodu až po kalibračnú značku a dôkladne premiešajte.

Tento destilát sa používa na určenie obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu (príloha II).

6.3 Liehoviny s obsahom etanolu viac než 50 % obj. alkoholu.

Odmerajte 100 ml liehoviny pomocou odmernej banky s objemom 100 ml a vylejte vzorku do banky so zaobleným dnom, ktorá je súčasťou destilačného prístroja.

Odmernú banku niekoľkokrát vypláchnite destilovanou vodou a výplachovú vodu pridajte k obsahu destilačnej banky so zaobleným dnom. Na vyplachovanie použite dostatočné množstvo vody na to, aby sa objem kvapaliny v banke zväčšil približne na 230 ml.

Nalejte 20 ml destilovanej vody do odmernej banky s objemom 200 ml, v ktorej bude uložený destilát. Túto banku potom musíte vložiť do studeného vodného kúpeľa (4.1) (10 až 15 °C pre liehoviny s anízovou príchuťou).

Destilujte, príležitostne premiešajte obsah banky, kým hladina destilátu neklesne niekoľko milimetrov pod kalibračnú značku na 200 ml odmernej banke.

Keď teplota tohto destilátu klesne na hodnotu v rozmedzí 0,5 °C od počiatočnej teploty kvapaliny, dolejte destilovanú vodu až po kalibračnú značku a dôkladne premiešajte.

Tento destilát sa používa na určenie obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu (príloha II).

▼B

Poznámka: Obsah etanolu v liehovine v objemových percentách alkoholu je dvojnásobne väčší než obsah etanolu v destiláte.

▼B

PRÍLOHA II: MERANIE HUSTOTY DESTILÁTU

METÓDA A: STANOVENIE SKUTOČNÉHO OBSAHU ETANOLU V LIEHOVINÁCH V OBJEMOVÝCH PERCENTÁCH ALKOHOLU - PIKNOMETRICKÉ MERANIE

A.1. **Princíp**

Obsah etanolu v objemových percentách alkoholu sa získa z hodnoty hustoty destilátu nameranej piknometricky.

A.2. **Reagenty a materiály**

Pokiaľ nie je uvedené inak, v priebehu analýzy používajte iba reagenty uznávanej analytickej triedy a vodu aspoň triedy 3 ako je definované v ISO 3696:1987.

A.2.1. Roztok chloridu sodného (2 % w/v)

Na prípravu 1 litra odvážte 20 g chloridu sodného a rozpustite ho v 1 litri vody.

A.3. **Prístroje a vybavenie**

Obvyklé laboratórne prístroje, najmä tie, ktoré sú uvedené ďalej:

A.3.1. Analytické váhy s rozlíšením 0,1 mg.

A.3.2. Teplomer so zabrúseným skleným spojom kalibrovaný v desatinách stupňa od 10 °C do 30 °C. Tento teplomer musí byť ciachovaný alebo skontrolovaný vzhľadom na ciachovaný teplomer.

A.3.3. Piknometer z pyrexového skla s objemom približne 100 ml osadený odnímateľným teplomerom so zabrúseným skleným spojom (A.3.2). Piknometer má bočnú trubku dlhú 25 mm s vnútorným priemerom 1 mm (maximálne) zakončenú zabrúseným kužeľovým spojom. Iné piknometre sú popísané v ISO 3507, napr. ak je to vhodné, môže sa použiť piknometer s objemom 50 ml.

A.3.4. Tarovacia fľaša s rovnakým vonkajším objemom (do 1 ml) ako piknometer a s hmotnosťou rovnou hmotnosti piknometra naplnená kvapalinou s hustotou 1,01 (roztok chloridu sodného A.2.1).

A.3.5. Tepelne izolovaný plášť, ktorý sa presne hodí na teleso piknometra.

Poznámka 1: Metóda určovania hustôt liehovín vo vákuu si vyžaduje použiť dvojmiskové váhy, piknometer a tarovaciu fľašu s rovnakým vonkajším objemom, ktorá bude v každom danom okamihu rušiť vztlakový účinok vzduchu. Túto jednoduchú techniku je možné uplatniť pomocou jednomiskových váh za predpokladu, že sa znova váži tarovacia fľaša tak, aby sa sledovali zmeny vztlaku v čase.

A.4. **Postup**

Predbežné poznámky:

Ďalej je popísaný postup využívajúci piknometer s objemom 100 ml pre stanovenie obsahu etanolu v liehovine v objemových percentách alkoholu; takým spôsobom sa získa najvyššia presnosť. Tiež je však možné použiť menší piknometer, napríklad s objemom 50 ml.

A.4.1. Kalibrácia piknometra

Piknometer sa kalibruje určením týchto parametrov:

— hmotnosť prázdneho piknometra,

— objem piknometra pri 20 °C,

— hmotnosť piknometra naplneného vodou pri 20 °C.

A.4.1.1. Kalibrácia pomocou jednomiskových váh:

Určite hodnotu:

— hmotnosti čistého, suchého piknometra (P),

— hmotnosti piknometra naplneného vodou pri t °C (P1),

— hmotnosti tarovacej fľaše (T0).

▼B

A.4.1.1.1. Odvážte čistý, suchý piknometer (P).

A.4.1.1.2. Opatrne naplňte piknometer destilovanou vodou s teplotou okolia a nasaďte teplomer.

Opatrne vytrite piknometer dosucha a vložte ho do tepelne izolovaného plášťa. Miešajte prevracaním nádoby dovtedy, kým sa neustáli hodnota teploty na teplomere

Hornou hranou bočnej trubky nastavte hladinu prepadu v piknometri. Starostlivo odčítajte teplotu t °C a ak treba, skorigujte ju na akékoľvek nepresnosti stupnice teploty.

Odvážte piknometer naplnený vodou (P1).

A.4.1.1.3. Odvážte tarovaciu fľašu (T0).

A.4.1.1.4. Výpočet

— Hmotnosť obalu prázdneho piknometra = P - m

kde m je hmotnosť vzduchu v piknometri.

m = 0,0012 x (P1 - P)

Poznámka 2: 0,0012 je hustota suchého vzduchu pri 20 °C a tlaku 760 mm Hg stĺpca.

— Objem piknometra pri 20 °C:

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

kde F_t je faktor teploty t °C prevzatý z tabuľky I v kapitole 1 „Hustota a merná tiaž“ prílohy k nariadeniu (EHS) č. 2676/90 (s. 10).

Hodnota $V_{20\,°C}$ musí byť známa s presnosťou na najbližšiu 0,001 ml.

— Hmotnosť vody v piknometri pri 20 °C:

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

kde 0,998203 je hustota vody pri 20 °C.

Poznámka 3: Ak je to potrebné, možno použiť hodnotu hustoty vzduchu 0,99715 a vypočítať obsah etanolu v liehovine v objemových percentách alkoholu vzhľadom na zodpovedajúcu hustotu vzduchu v Tabuľkách ciel a nepriamych daní Jej Veličenstva (HM).

A.4.1.2. Metóda kalibrácie pomocou dvojmiskových váh:

A.4.1.2.1. Položte tarovaciu fľašu na ľavú misku a čistý, suchý piknometer s nasadenou zbernou zátkou na pravú misku. Vyvážte ich položením závaží na stranu piknometra: p gramov.

A.4.1.2.2. Opatrne naplňte piknometer destilovanou vodou s teplotou okolia a nasaďte teplomer; opatrne vytrite piknometer dosucha a vložte ho do tepelne izolovaného plášťa; miešajte prevracaním nádoby dovtedy, kým sa neustáli hodnota teploty na teplomere.

Presne nastavte hladinu po hornú hranu bočnej trubky. Vyčistite bočnú trubku, nasaďte zbernú zátku; odčítajte opatrne hodnotu teploty t C a ak treba, skorigujte ju na všetky nepresnosti stupnice teploty.

Odvážte piknometer naplnený vodou tak, že dosiahnete rovnováhu závažiami s hmotnosťou p’ gramov.

A.4.1.2.3. Výpočet

— Hmotnosť obalu prázdneho piknometra = p + m

kde m je hmotnosť vzduchu v piknometri.

m = 0,0012 x (p - p’)

▼B

— Objem piknometra pri 20 °C:

$V_{20°C} = (p + m - p') \times F_t$

kde F_t je faktor teploty t °C prevzatý z tabuľky I v kapitole 1 „Hustota a merná tiaž“ prílohy k nariadeniu (EHS) č. 2676/90 (s. 10).

Hodnota $V_{20\ °C}$ musí byť známa s presnosťou na najbližšiu 0,001 ml.

— Hmotnosť vody v piknometri pri 20 °C:

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

kde 0,998203 je hustota vody pri 20 °C.

A.4.2. Stanovenie obsahu etanolu v skúšobnej vzorke v objemových percentách alkoholu

A.4.2.1. Použitie jednomiskových váh.

A.4.2.1.1. Odvážte tarovaciu fľašu, jej hmotnosť označte T1.

A.4.2.1.2. Odvážte piknometer s pripraveným destilátom (pozri príloha I), jeho hmotnosť pri t °C označte P2.

A.4.2.1.3. Výpočet

— dT = T1 - T0

— Hmotnosť prázdneho piknometra v okamihu merania

= P - m + dT

— Hmotnosť kvapaliny v piknometri pri t °C

= P2 - (P - m + dT)

— Hustota pri t °C v g/ml

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

— Vyjadrite hustotu pri t °C v kilogramoch na m^3 vynásobením $\rho_{t\ °C}$ číslom 1 000. Táto hodnota je známa ako ρ_t.

Skorigujte ρ_t na 20 °C pomocou tabuliek hustoty ρ_T pre zmesi vody a alkoholu (tabuľka II v prílohe k príručke analytických metód OIV (1994) s. 17-29).

V tabuľke nájdite vodorovný riadok, ktorý zodpovedá celej hodnote teploty T v stupňoch hneď pod hodnotou t °C a najmenšiu hustotu nad hodnotou ρ_t. Zistený tabuľkový rozdiel pod touto hodnotou hustoty využite na výpočet hustoty liehu ρ_t pri tej celej hodnote teploty T v stupňoch.

— Pomocou celého riadku s hodnotami teploty vypočítajte rozdiel medzi hustotou ρ', ktorú nájdete v tabuľke hneď nad hodnotou ρ_t a vypočítanou hodnotou ρ_t. Vydeľte tento rozdiel zisteným tabuľkovým rozdielom vpravo od hodnoty hustoty ρ'. Podiel predstavuje desatinnú časť obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu, kým celú časť obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu nájdete navrchu toho stĺpca, v ktorom sa nachádza hodnota ρ' (Dt, sila v objemových percentách alkoholu).

Poznámka 4: Alternatívne, keď dolievate piknometer po značku, nechajte ho vo vodnom kúpeli udržiavanom na teplote 20 °C (± 0,2 °C).

A.4.2.1.4. Výsledok

Pomocou hustoty ρ_{20} vypočítajte skutočný obsah etanolu v objemových percentách alkoholu a použite pritom ďalej určené tabuľky obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu:

Tabuľkou, ktorá udáva hodnoty obsahu etanolu v zmesiach vody s alkoholom v objemových percentách alkoholu (% obj.) pri 20 °C v závislosti od hustoty pri 20 °C, je medzinárodná tabuľka, ktorú prijala Medzinárodná organizácia legálnej metrológie vo svojom odporúčaní č. 22.

A.4.2.2. Metóda využívajúca dvojmiskové váhy

▼B

A.4.2.2.1. Odvážte piknometer s pripraveným destilátom (pozri časť I), jej hmotnosť pri t °C je p''.

A.4.2.2.2. Výpočet

— Hmotnosť kvapaliny v piknometri pri t °C

= p + m - p''

— Hustota pri t °C v g/ml

$P_{t°C} = (p + m - p'')/V_{20°C}$

— Pri výpočte obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu pri 20 °C vyjadrite hustotu pri t °C v kilogramoch na m^3 a skorigujte teplotu takým spôsobom, ako je uvedené v prípade použitia jednomiskových váh.

A.5. **Pracovné charakteristiky metódy (presnosť)**

A.5.1 Štatistické výsledky medzilaboratórnej porovnávacej skúšky

Ďalej uvedené údaje boli získané z medzinárodnej porovnávacej štúdie metódy, ktorá bola vypracovaná podľa medzinárodne odsúhlasených postupov [1], [2].

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	20
Počet vzoriek	6

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	19	20	17	19	19	17
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	1	–	2	1	1	3
Počet akceptovaných výsledkov	38	40	34	38	38	34
Stredná hodnota($\bar{x}$)% obj.	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) % obj.	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Limit opakovateľnosti (r) v % obj.	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) obj.	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	0,52	0,52	0,38	0,57	0,54	0,53
Limit reprodukovateľnosti (R) v % obj.	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Typy vzoriek
A Ovocný likér; rozdelená úroveň (split level) (*).
B Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
C Whisky; slepé duplikáty.
D Grappa; rozdelená úroveň (*).
E Akvavit; rozdelená úroveň (*).
F Rum; rozdelená úroveň (*).

METÓDA B: STANOVENIE SKUTOČNÉHO OBSAHU ETANOLU V LIEHOVINÁCH V OBJEMOVÝCH PERCENTÁCH ALKOHOLU - ELEKTRONICKÉ MERANIE HUSTOTY (ZALOŽENÉ NA OSCILÁCII VZORKY NA REZONANČNEJ FREKVENCII V OSCILAČNEJ KOMORE)

B.1. **Princíp**

Hustota kvapaliny sa určuje elektronickým meraním oscilácií vibračnej U-trubky. Kvôli realizácii tohto merania sa vzorka vkladá

▼B

do oscilujúceho systému, ktorého špecifická frekvencia oscilácií sa v dôsledku pridanej hmotnosti zmení.

B.2. **Reagenty a materiály**

Pokiaľ nie je uvedené inak, v priebehu analýzy používajte iba reagenty uznávanej analytickej triedy a vodu aspoň triedy 3 ako je definované v ISO 3696:1987.

B.2.1. Acetón (CAS 666-52-4) alebo absolútny alkohol.

B.2.2. Suchý vzduch.

B.3. **Prístroje a vybavenie**

Obvyklé laboratórne prístroje, najmä tie, ktoré sú uvedené ďalej:

B.3.1. Hustomer s digitálnym displejom

Elektronický hustomer určený pre vykonávanie takýchto meraní musí byť schopný vyjadriť hustotu v g/ml na 5 desatinných miest.

Poznámka 1: Hustomer by mal byť umiestnený na dokonale stabilnom stojane, ktorý je oddelený od všetkých vibrácií.

B.3.2. Regulácia teploty

Výsledky činnosti hustomera sú platné iba vtedy, keď je meracia komora pripojená k vstavanému regulátoru teploty, ktorý je schopný dosiahnuť rovnakú teplotnú stabilitu ± 0,02 °C alebo lepšiu.

Poznámka 2: Presné nastavenie a sledovanie teploty v meracej komore je veľmi dôležité, pretože chyba veľkosti 0,1 °C môže viesť k zmene hustoty rádovo o 0,1 kg/m^3.

B.3.3. Injekčné striekačky pre vstrekovanie vzoriek alebo automatický dávkovač.

B.4. **Postup**

B.4.1. Kalibrácia hustomera

Prístroj sa musí kalibrovať podľa pokynov výrobcu prístroja vtedy, keď sa po prvýkrát uvádza do činnosti. Potom sa musí pravidelne kalibrovať a kontrolovať vzhľadom na overený referenčný štandard alebo laboratórny vnútorný referenčný roztok založený na overenom referenčnom štandarde.

B.4.2. Určenie hustoty vzorky

B.4.2.1. Ak je to potrebné, predtým, než začnete merať, vyčistite meraciu komoru acetónom alebo absolútnym alkoholom a vysušte ju suchým vzduchom. Vypláchnite komoru vzorkou.

B.4.2.2. Vstreknite vzorku do komory (pomocou injekčnej striekačky alebo automatickým dávkovačom) tak, aby sa komora celkom zaplnila. Počas plnenia sa presvedčite, že všetky vzduchové bublinky sú úplne odstránené. Vzorka musí byť homogénna a nesmie obsahovať žiadne tuhé častice. Všetky rozptýlené látky by sa mali pred začatím analýzy odstrániť filtrovaním.

B.4.2.3. Po ustálení meranej hodnoty zaznamenajte hustotu ρ_{20} alebo obsah etanolu v percentách alkoholu zobrazenú na displeji hustomeru.

B.4.3. Výsledok

Keď používate hustotu ρ_{20}, vypočítajte skutočný obsah etanolu v objemových percentách alkoholu a použite pritom ďalej určené tabuľky obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu:

Tabuľkou, ktorá udáva hodnoty obsahu etanolu v zmesiach vody s alkoholom v objemových percentách alkoholu (obj.) pri 20 °C v závislosti od hustoty pri 20 °C, je medzinárodná tabuľka, ktorú prijala Medzinárodná organizácia legálnej metrológie vo svojom Odporúčaní č. 22.

B.5. **Pracovné charakteristiky metódy (presnosť)**

B.5.1 Štatistické výsledky medzilaboratórnej porovnávacej skúšky

▼B

Nasledovné údaje boli získané z medzinárodnej porovnávacej štúdie metódy, ktorá bola vypracovaná podľa medzinárodne odsúhlasených postupov [1], [2].

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	16
Počet vzoriek	6

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	11	13	15	16	14	13
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	2	3	1	–	1	2
Počet akceptovaných výsledkov	22	26	30	32	28	26
Stredná hodnota($\bar{x}$)% obj.	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) % obj.	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Limit opakovateľnosti (r) v % obj.	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) % obj.	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Limit reprodukovateľnosti (R) v % obj.	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Typy vzoriek
A Ovocný likér; rozdelená úroveň (split level) (*).
B Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
C Whisky; slepé duplikáty.
D Grappa; rozdelená úroveň (*).
E Akvavit; rozdelená úroveň (*).
F Rum; rozdelená úroveň (*).

METÓDA C: STANOVENIE SKUTOČNÉHO OBSAHU ETANOLU V LIEHOVINÁCH V OBJEMOVÝCH PERCENTÁCH ALKOHOLU - MERANIE HUSTOTY POMOCOU HYDROSTATICKÝCH VÁH

C.1. Princíp

Obsah etanolu v liehovinách v objemových percentách alkoholu je možné merať odmeraním hustoty pomocou hydrostatických váh založených na Archimedovom zákone, podľa ktorého teleso ponorené do kvapaliny je nadľahčované silou rovnou hmotnosti kvapaliny telesom vytlačenej.

C.2. Reagenty a materiály

Pokiaľ nie je uvedené inak, v priebehu analýzy používajte iba reagenty uznávanej analytickej triedy a vodu aspoň triedy 3 ako je definované v ISO 3696:1987.

C.2.1. Čistiaci roztok plaváka (hydroxid sodný, 30 % w/v)

Na prípravu 100 ml odvážte 30 g hydroxidu sodného a dolejte do potrebného objemu 96 % obj. etanolu.

C.3. Prístroje a vybavenie

Obvyklé laboratórne prístroje, najmä tie, ktoré sú uvedené ďalej:

C.3.1. Jednomiskové hydrostatické váhy s citlivosťou 1 mg.

C.3.2. Plavák s objemom aspoň 20 ml špeciálne prispôsobený váham zavesený na vlákne s priemerom najviac 0,1 mm.

▼B

C.3.3. Merací valec, na ktorom je vyznačená výšková značka. Plavák sa musí celý vojsť do objemu valca pod značkou; cez povrch kvapaliny môže prechádzať iba závesné vlákno. Merací valec musí mať vnútorný priemer aspoň o 6 mm väčší ako je priemer plaváka.

C.3.4. Teplomer (alebo sonda na meranie teploty) ociachovaný v stupňoch a desatinách stupňa od 10 do 40 °C a kalibrovaný po 0,05 °C.

C.3.5. Závažia kalibrované uznávaným certifikačným orgánom.

Poznámka 1: Tiež je možné použiť dvojmiskové váhy; princíp je popísaný v kapitole 1 „Hustota a merná tiaž“ v prílohe k nariadeniu (EHS) č. 2676/90 (s. 7).

C.4. **Postup**

Plavák a merací valec sa musia pred každým meraním vyčistiť destilovanou vodou, vysušiť mäkkým laboratórnym papierom, ktorý nezanecháva vlákna a vypláchnuť tým roztokom, ktorého hustota sa má stanoviť. Merania sa musia vykonávať hneď po ustálení prístroja, aby sa obmedzili straty alkoholu vyparovaním.

C.4.1. Kalibrácia váh

Hoci váhy sú obvykle vybavené vnútorným kalibračným systémom, musí existovať možnosť kalibrovať hydrostatické váhy pomocou závaží kontrolovaných úradným certifikačným orgánom.

C.4.2. Kalibrácia plaváka

C.4.2.1. Naplňte merací valec až po značku dvakrát destilovanou vodou (alebo vodou s ekvivalentnou čistotou, napr. mikrofiltrovanou vodou s vodivosťou 18,2 MΩ/cm) s teplotou medzi 15 a 25 °C, ale najvhodnejšia je 20 °C.

C.4.2.2. Ponorte do valca plavák a teplomer, miešajte a odčítajte na prístroji hodnotu hustoty kvapaliny a ak treba, skorigujte odčítanú hodnotu tak, aby sa rovnala hustote vody pri teplote merania.

C.4.3. Kontrola pomocou vodného roztoku alkoholu

C.4.3.1. Naplňte merací valec až po značku zmesou vody a alkoholu so známym obsahom etanolu a s teplotou medzi 15 a 25 °C, ale najvhodnejšia je 20 °C.

C.4.3.2. Ponorte do valca plavák a teplomer, miešajte a odčítajte na prístroji hodnotu hustoty kvapaliny (alebo obsah etanolu v percentách objemu alkoholu, ak je to možné). Takto určený obsah etanolu v percentách objemu alkoholu by sa mal rovnať obsahu etanolu určenému podľa predchádzajúceho bodu.

Poznámka 2: Tento roztok so známym obsahom etanolu v objemových percentách alkoholu sa môže použiť aj pri kalibrácii plaváka namiesto dvakrát destilovanej vody.

C.4.4. Meranie hustoty destilátu (alebo jeho obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu, ak to prístroj umožňuje)

C.4.4.1. Nalejte skúšobnú vzorku do meracieho valca až po ciachovnú značku.

C.4.4.2. Ponorte do valca plavák a teplomer, premiešajte a odčítajte na prístroji hodnotu hustoty kvapaliny (alebo obsah etanolu v percentách objemu alkoholu, ak je to možné). Ak sa hustota meria pri t °C (ρ_t), zaznamenajte si hodnotu teploty.

C.4.4.3. Skorigujte ρ_t na teplotu 20 °C pomocou tabuľky hustôt ρT pre zmesi vody a alkoholu (tabuľka II v prílohe II k Príručke analytických metód OIV(1994), s. 17-29).

C.4.5. Čistenie plaváka a meracieho valca

C.4.5.1. Ponorte plavák do čistiaceho roztoku plaváka v meracom valci.

C.4.5.2. Nechajte plavák namočený jednu hodinu a periodicky ním otáčajte.

C.4.5.3. Opláchnite výdatnými množstvami vody z vodovodu a po nej destilovanou vodou.

C.4.5.4. Vysušte mäkkým laboratórnym papierom, ktorý nezanecháva vlákna.

▼B

Tento postup absolvujte po prvom použití plaváka a potom pravidelne podľa potreby.

C.4.6. Výsledok

Pomocou hustoty ρ_{20} vypočítajte skutočný obsah etanolu silu v objemových percentách alkoholu a použite pritom ďalej určené tabuľky obsahu etanolu v objemových percentách alkoholu.

Tabuľkou, ktorá udáva hodnoty obsahu etanolu v zmesiach vody s alkoholom v objemových percentách alkoholu (% obj.) pri 20 °C v závislosti od hustoty pri 20 °C, je medzinárodná tabuľka, ktorú prijala Medzinárodná organizácia legálnej metrológie vo svojom odporúčaní č. 22.

C.5. **Pracovné charakteristiky metódy (presnosť)**

C.5.1 Štatistické výsledky medzilaboratórnej porovnávacej skúšky

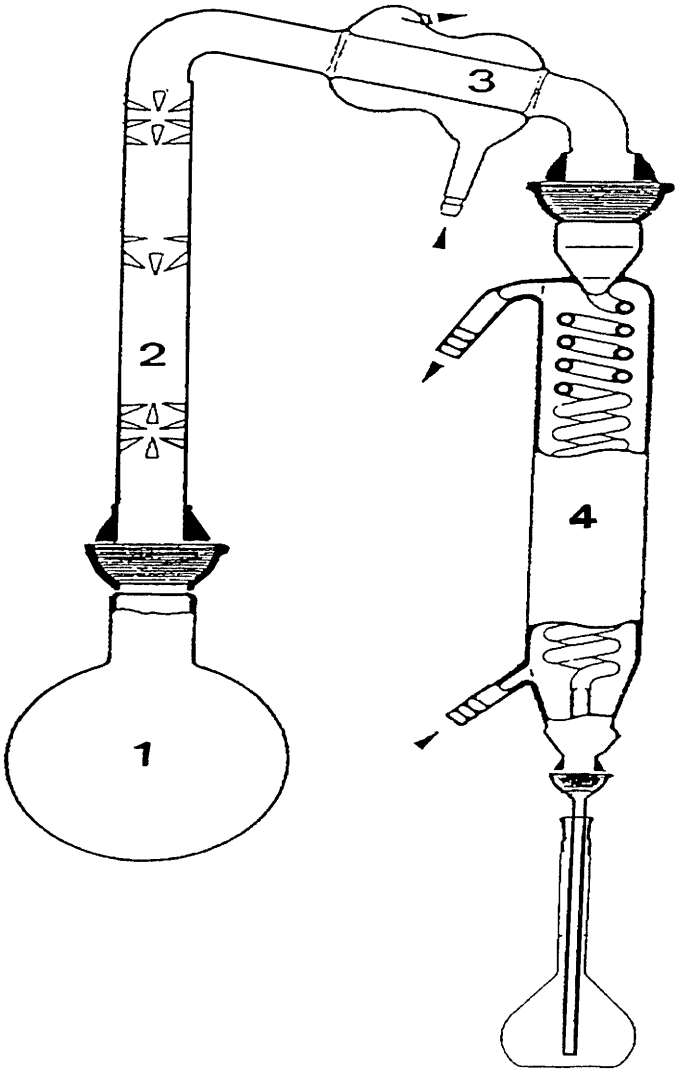
Nasledovné údaje boli získané z medzinárodnej porovnávacej štúdie metódy, ktorá bola vypracovaná podľa medzinárodne odsúhlasených postupov [1], [2].

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	12
Počet vzoriek	6

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	12	10	11	12	11	9
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	–	2	1	–	1	2
Počet akceptovaných výsledkov	24	20	22	24	22	18
Stredná hodnota($\bar{x}$)% obj.	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) % obj.	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Pomerná štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Limit opakovateľnosti (r) v % obj.	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) % obj.	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Limit reprodukovateľnosti (R) v % obj.	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Typy vzoriek
A Ovocný likér; rozdelená úroveň (split level) (*).
B Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
C Whisky; slepé duplikáty.
D Grappa; rozdelená úroveň (*).
E Akvavit; rozdelená úroveň (*).
F Rum; rozdelená úroveň (*).

▼B



Obrázok 1: Destilačný prístroj na meranie skutočného obsahu etanolu v liehovinách v objemových percentách alkoholu

1. 1 litrová banka so zaobleným dnom a s normalizovaným guľovým zabrúseným skleným spojom.

2. 20 cm vysoká Vigreuxova rektifikačná kolóna.

3. 10 cm dlhý kondenzátor s priamym okrajom typu West.

4. 40 cm chladiaca špirála.

▼B

II STANOVENIE CELKOVEJ SUŠINY V LIEHOVINÁCH GRAVIMETRICKÝM MERANÍM

1. **Zameranie**

Nariadenie (EHS) č. 1576/89 stanovuje, že túto metóda sa používa iba pre akvavit, u ktorého je koncentrácia sušiny obmedzená na 15 g/l.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696:1987: Voda pre analytické laboratórne využitie - Technické údaje a skúšobné metódy

3. **Definícia**

Do celkovej sušiny alebo do celkového obsahu suchých látok patria všetky látky, ktoré v stanovených fyzikálnych podmienkach nie sú prchavé.

4. **Princíp**

Odváženie zvyšku, ktorý zostal po odparení liehoviny vloženej do kúpeľa s vriacou vodou a vysušenie v sušiacej piecke.

5. **Prístroje a vybavenie**

5.1. Valcová odparovacia nádoba s plochým dnom a s priemerom 55 mm.

5.2. Kúpeľ s vriacou vodou.

5.3. Pipeta 25 ml, trieda A.

5.4. Sušiaca piecka.

5.5. Vysušovač (exsikátor).

5.6. Analytické váhy s presnosťou na 0,1 mg.

6. **Odber vzoriek a vzorky**

Vzorky sa pred analýzou skladujú pri izbovej teplote.

7. **Postup**

7.1. Pipetou preneste 25 ml liehoviny, ktorá obsahuje menej než 15 g/l sušiny, do valcovej odparovacej nádoby s plochým dnom a priemerom 55 mm, ktorú ste predtým odvážili. Počas prvej hodiny odparovania je odparovacia nádoba položená na veku kúpeľa s vriacou vodou tak, aby kvapalina nevrela, pretože by to mohlo viesť k stratám vyšpliechaním. Ďalšiu hodinu nechajte nádobu v styku s parou z kúpeľa s vriacou vodou.

7.2. Dokončite sušenie vložením odparovacej nádoby na dve hodiny do sušiacej piecky pri teplote 105 °C ± 3 °C. Nechajte odparovaciu nádobu vychladnúť vo vysušovači a odvážte ju aj jej obsah.

8. **Výpočet**

Hmotnosť zvyšku vynásobená 40 sa rovná koncentrácii sušiny obsiahnutej v liehovine a musí sa vyjadriť v g/l na jedno desatinné miesto.

9. **Pracovné charakteristiky metódy (presnosť)**

9.1 Štatistické výsledky medzilaboratórnej porovnávacej skúšky

Ďalej uvedené údaje boli získané z medzinárodnej porovnávacej štúdie metódy, ktorá bola vypracovaná podľa medzinárodne odsúhlasených postupov [1], [2].

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	10
Počet vzoriek	4

Vzorky	A	B	C	D
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	9	9	8	9

▼B

Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	1	1	2	–
Počet akceptovaných výsledkov	18	18	16	18
Stredná hodnota($\bar{x}$)g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Limit opakovateľnosti (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Rum; rozdelená úroveň (split level).
C Grappa; rozdelené úrovne.
D Akvavit; rozdelené úrovne.

▼B

III. STANOVENIE PRCHAVÝCH LÁTOK A METANOLU V LIEHOVINÁCH

III.1. VŠEOBECNÉ POZNÁMKY

1. **Definície**

Nariadenie (EHS) č. 1576/89 stanovuje pre určitú skupinu liehovín (rum, liehoviny vinohradníckeho pôvodu, ovocné liehoviny atď.) minimálne koncentrácie prchavých zlúčenín okrem etanolu a metanolu. Pre túto skupinu nápojov sa tieto koncentrácie konvenčne považujú za rovnocenné súčtu koncentrácií:

1. prchavých kyselín vyjadrených ako koncentrácia kyseliny octovej;

2. aldehydov vyjadrených ako etanal súčtom koncentrácií etanalu (acetaldehydu) a etanalovej frakcie obsiahnutej v 1,1-dietoxyetáne (v acetále);

3. týchto vyšších alkoholov: propán-1-ol, bután-1-ol, bután-2-ol, 2-metylpropán-1-ol, analyzovaných ako individuálny alkohol a 2-metylbután-1-ol a 3-metylbután-1-ol, analyzovaných ako individuálny alkohol alebo súčet koncentrácií týchto dvoch alkoholov;

4. etylacetátu.

Ďalej sú uvedené konvenčné metódy merania koncentrácií prchavých zlúčenín:

— prchavé kyseliny prostredníctvom koncentrácie prchavých kyselín,

— aldehydy (etanal a acetal), etylacetát a alkoholy metódou plynovej chromatografie (GPC).

2. **Analýza prchavých zlúčením metódou plynovej chromatografie**

Môže sa ukázať, že analýzy iných ako vyššie uvedených prchavých zlúčenín metódou plynovej chromatografie sú zvlášť zaujímavé ako prostriedok určovania pôvodu suroviny použitej pri destilácii a skutočných podmienok destilácie.

Niektoré liehoviny obsahujú iné prchavé zložky, ako sú aromatické zlúčeniny, ktoré sú charakteristické pre suroviny použité na získanie alkoholu, pre arómu liehoviny a pre zvláštne prvky prípravy liehoviny. Tieto zlúčeniny sú dôležité pre vyhodnocovanie požiadaviek stanovených v nariadení (EHS) č. 1576/89.

III.2. STANOVENIE PRCHAVÝCH ZLOŽIEK: ALDEHYDOV, VYŠŠÍCH ALKOHOLOV, ETYLACETÁTU A METANOLU METÓDOU PLYNOVEJ CHROMATOGRAFIE

1. **Zameranie**

Táto metóda je vhodná na použitie pri určovaní koncentrácií týchto zlúčenín: 1,1-dietoxyetán (acetál), 2-metylbután-1-ol (aktívny amylalkohol), 3-metylbután-1-ol (izoamylalkohol), metanol (metylalkohol), etyl etanoát (etylacetát), bután-1-ol (n-butanol), bután-2-ol (sekundárny butanol), 2-metylpropán-1-ol (izobutylalkohol), propán-1-ol (n-propanol) a etanal (acetaledhyd) v liehovinách na princípe plynovej chromatografie. Metóda využíva vnútorný štandard, napríklad pentán-3-ol. Koncentrácie analyzovaných látok sa vyjadrujú v gramoch na 100 litrov absolútneho alkoholu; obsah etanolu v objemových percentách alkoholu sa musí určiť pred vykonaním analýzy. Medzi liehoviny, ktoré môžu byť analyzované touto metódou, patria whisky, ovocná pálenka (brandy), vínne liehoviny, ovocné liehoviny a liehoviny z hroznových výliskov.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696:1987: Voda pre analytické laboratórne využitie - Technické údaje a skúšobné metódy.

3. **Definícia**

Kongenery (spoluvznikajúce zložky) sú prchavé látky, ktoré vznikajú spolu s etanolom v priebehu kvasenia, destilácie a dozrievania liehovín.

▼B

4. **Princíp**

Koncentrácie spoluvznikajúcich zložiek v liehovinách sa určujú priamym vstreknutím liehoviny alebo vhodne zriedenej liehoviny do systému plynovej chromatografie (GC) systému. Pred vstreknutím sa do liehoviny pridá vhodný vnútorný štandard. Spoluvznikajúce zložky sa separujú na vhodnej kolóne programovým riadením teploty a zisťujú sa pomocou plameňového ionizačného detektora (FID). Koncentrácia každej spoluvznikajúcej zložky sa určuje vzhľadom na vnútorný štandard z faktorov odozvy, ktorých hodnoty sa získavajú v priebehu kalibrácie v rovnakých chromatografických podmienkach, ako sú tie, ktoré sú vytvorené počas analýzy liehoviny.

5. **Reagenty a materiály**

Pokiaľ nie je uvedené inak, používajte iba reagenty s vyššou čistotou než 97 %, kúpené od dodávateľa s akreditáciou podľa noriem ISO, s certifikátom čistoty, ktoré pri skúšobnom zriedení neobsahujú iné spoluvznikajúce zložky (môže sa to potvrdiť vstreknutím štandardov jednotlivých spoluvznikajúcich zložiek pri skúšobnom zriedení v podmienkach plynovej chromatografie definovaných v bode 6.4) a iba takú vodu, ktorá má aspoň triedu 3 definovanú v norme ISO 3696. Acetal a acetaldehyd sa musia skladovať v tme pri teplote < 5 ° C, všetky ostatné reagenty sa môžu skladovať pri izbovej teplote.

5.1. Absolútny etanol (CAS 64-17-5).

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

5.3. Propán-1-ol (CAS 71-23-8).

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

5.5. Prijateľné vnútorné štandardy: pentán-3-ol (CAS 584-02-1), pentán-1-ol (CAS 71-41-0), 4-metylpentán-1-ol (CAS 626-89-1) alebo metylnonaoát (CAS 1731-84-6).

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

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

5.8. Etylacetát (CAS 141-78-6).

5.9. Bután-1-ol (CAS 71-36-3).

5.10. Bután-2-ol (CAS 78-92-2).

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

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

5.13. 40 v/v roztok etanolu

Na prípravu roztoku etanolu s koncentráciou 400 ml/l nalejte 400 ml etanolu (5.1) do odmernej banky s objemom 1 liter, dolejte do tohto objemu destilovanú vodu a premiešajte.

5.14. Príprava a skladovanie štandardných roztokov (postup používaný pre validovanú metódu).

Všetky štandardné roztoky sa musia skladovať pri teplote < 5 °C a každý mesiac sa musia pripraviť čerstvé roztoky. Hmotnosti zložiek a roztokov by sa mali zaznamenávať s presnosťou na najbližšiu 0,1 mg.

5.14.1. Štandardný roztok – A

Pipetou preneste ďalej uvedené reagenty do odmernej banky s objemom 100 ml, ktorá kvôli minimalizácii odparovania zložiek už obsahuje približne 60 ml roztoku etanolu (5.13), dolejte roztok etanolu (5.13) do 100 ml a dôkladne premiešajte. Zaznamenajte si hmotnosť odmernej banky, každej pridanej zložky a celkovú konečnú hmotnosť obsahu.

Zložka	Objem (ml)
Metanol (5.2)	3,0
Propán-1-ol (5.3)	3,0
2-metylpropán-1-ol (5.4)	3,0

▼B

2-metylbután-1-ol (5.6)	3,0
3-metylbután-1-ol (5.7)	3,0
Etylacetát (5.8)	3,0
Bután-1-ol (5.9)	3,0
Bután-2-ol (5.10)	3,0
Acetaldehyd (5.11)	3,0
Acetál (5.12)	3,0

Poznámka 1: Kvôli minimalizácii strát odparovaním je lepšie pridať acetal a acetaldehyd až nakoniec.

5.14.2. Štandardný roztok – B

Pipetou preneste 3 ml pentán-3-olu alebo iného vhodného vnútorného štandardu (5.5) do odmernej banky s objemom 100 ml, ktorá už obsahuje približne 80 ml roztoku etanolu (5.13), dolejte roztok etanolu (5.13) do 100 ml a dôkladne premiešajte.

Zaznamenajte si hmotnosť odmernej banky, hmotnosť pentán-3-olu alebo iného pridaného vnútorného štandardu a celkovú konečnú hmotnosť obsahu.

5.14.3. Štandardný roztok – C

Pipetou preneste 1 ml roztoku A (5.14.1) a 1 ml roztoku B (5.14.2) do odmernej banky s objemom 100 ml, ktorá už obsahuje približne 80 ml roztoku etanolu (5.13), dolejte roztok etanolu (5.13) do 100 ml a dôkladne premiešajte.

Zaznamenajte si hmotnosť odmernej banky, hmotnosť každej pridanej zložky a celkovú konečnú hmotnosť obsahu.

5.14.4. Štandardný roztok – D

Kvôli udržaniu analytickej kontinuity pripravte štandardný roztok pre kontrolu kvality pomocou predtým pripraveného štandardného roztoku A (5.14.1). Pipetou preneste 1 ml roztoku A (5.14.1) do odmernej banky s objemom 100 ml, ktorá už obsahuje približne 80 ml roztoku etanolu (5.13), dolejte roztok etanolu (5.13) do 100 ml a dôkladne premiešajte.

Zaznamenajte si hmotnosť odmernej banky, hmotnosť každej pridanej zložky a celkovú konečnú hmotnosť obsahu.

5.14.5. Štandardný roztok – E

Pipetou preneste 10 ml roztoku B (5.14.2) do odmernej banky s objemom 100 ml, ktorá už obsahuje približne 80 ml roztoku etanolu (5.13), dolejte roztok etanolu (5.13) do 100 ml a dôkladne premiešajte.

Zaznamenajte si hmotnosť odmernej banky, hmotnosť každej pridanej zložky a celkovú konečnú hmotnosť obsahu.

5.14.6. Štandardné roztoky používané na kontrolu linearity odozvy plameňového ionizačného detektora

Do samostatných odmerných baniek s objemom 100 ml, ktoré už obsahujú 80 ml roztoku etanolu (5.13) preneste pipetou 0, 0,1, 0,5, 1,0 a 2,0 ml roztoku A (5.14.1) a 1 ml roztoku B (5.14.2), dolejte roztok etanolu (5.13) do 100 ml a dôkladne premiešajte.

Zaznamenajte si hmotnosť odmernej banky, hmotnosť každej pridanej zložky a celkovú konečnú hmotnosť obsahu.

5.14.7. Štandardný roztok používaný na kontrolu kvality

Pipetou preneste 9 ml štandardného roztoku D (5.14.4) a 1 ml štandardného roztoku E (5.14.5) do navažovacej nádoby a dôkladne premiešajte.

Zaznamenajte si hmotnosť odmernej banky, hmotnosť každej pridanej zložky a celkovú konečnú hmotnosť obsahu.

▼B

6. **Prístroje a vybavenie**

6.1. Prístroj schopný merať hustotu a silu v objemových percentách alkoholu.

6.2. Analytické váhy schopné merať na štyri desatinné miesta.

6.3. Plynový chromatograf s programovým riadením teploty osadený plameňovým ionizačným detektorom a integrátorom alebo iným systémom na spracovanie údajov schopný merať plochy alebo výšky píkov.

6.4. Plynová(é) chromatografická(é) kolóna(y) schopná(é) separovať analyzované látky takým spôsobom, že minimálne rozlíšenie medzi jednotlivými zložkami (okrem 2-metylbután-1-olu a 3-metylbután-1-olu) je najmenej 1,3.

Poznámka 2: Vhodnými príkladmi sú tieto kolóny a podmienky plynovej chromatografie:

1. Predkolóna 1 m x vnútorný priemer 0,32 mm pripojená ku kolóne CP-WAX 57 CB 50 m x vnútorný priemer 0,32 mm s hrúbkou vrstvy 0,2 μm (stabilizovaný polyetylénglykol), za ktorou je zapojená kolóna Carbowax 400 50 m x vnútorný priemer 0,32 mm s hrúbkou vrstvy 0,2 μm. (Kolóny sú spojené pomocou lisovaných konektorov.)

Nosný plyn a tlak:	hélium (135 kPa)
Teplota na kolóne:	35° C po dobu 17 minút, z 35 na 70° C s rýchlosťou nárastu 12° C/min, držať na 70° C po dobu 25 minút.
Teplota v injektore:	150° C
Teplota detektora:	250° C
Vstrekovaný objem:	1 μl, *split* 20 až 100:1

2. Predkolóna 1 m x vnútorný priemer 0,32 mm pripojená ku kolóne CP-WAX 57 CB 50 m x vnútorný priemer 0,32 mm s hrúbkou vrstvy 0,2 μm (stabilizovaný polyetylénglykol). (Predkolóna je pripojená pomocou lisovaného konektora.)

Nosný plyn a tlak:	hélium (65 kPa)
Teplota na kolóne:	35° C po dobu 10 minút, z 35 na 110° C s rýchlosťou nárastu 5° C/min, zo 110 na 190° C s rýchlosťou nárastu 30° C/min, držať na 190° C po dobu 2 minút.
Teplota v injektore:	260° C
Teplota detektora:	300° C
Vstrekovaný objem:	1 μl, *split* 55:1

3. Náplňová kolóna (5 CW 20M, Carbopak B), 2 m x vnútorný priemer 2 mm.

Teplota v kolóne:	65° C po dobu 4 minút, zo 65 na 140° C s rýchlosťou nárastu 10° C/min, držať na 140° C po dobu 5 minút, zo 140 na 150° C rýchlosťou nárastu 5° C/min, držať na 150° C po dobu 3 minút.
Teplota v injektore:	65° C
Teplota detektora:	200° C
Vstrekovaný objem:	1 μl

▼B

7. **Odber vzoriek a vzorky**

7.1. Laboratórna vzorka

Po prijatí sa meria obsah etanolu v každej vzorke v objemových percentách alkoholu (6.1).

8. **Postup (používaný pre schválenú metódu)**

8.1. Skúšobná vzorka

8.1.1. Odvážte vhodnú utesnenú navažovaciu nádobu a zaznamenajte si jej hmotnosť.

8.1.2. Pipetou preneste do nádoby 9 ml laboratórnej vzorky a zaznamenajte si hmotnosť (M_{VZORKA}).

8.1.3. Pridajte 1 ml štandardného roztoku E (5.14.5) a zaznamenajte si hmotnosť (M_{IS}).

8.1.4. Skúšobný materiál riadne premiešajte (nádobu aspoň 20 krát prevráťte). Pred analýzou sa vzorky musia skladovať pri teplote menej než 5 °C, aby sa minimalizovali straty odparovaním.

8.2. Slepý pokus (blank)

8.2.1. Na váhach, ktoré sú schopné merať na štyri desatinné miesta (6.2), odvážte vhodnú navažovaciu nádobu a zaznamenajte si jej hmotnosť.

8.2.2. Pipetou preneste do nádoby 9 ml roztoku etanolu (5.13) s koncentráciou 400 ml/l a zaznamenajte si hmotnosť.

8.2.3. Pridajte 1 ml štandardného roztoku E (5.14.5) a zaznamenajte si hmotnosť.

8.2.4. Skúšobný materiál riadne premiešajte (nádobu aspoň 20-krát prevráťte). Pred analýzou sa vzorky musia skladovať pri teplote menej než 5 °C, aby sa minimalizovali straty odparovaním.

8.3. Predbežná skúška

Vstreknite štandardný roztok C (5.14.3), čím sa zabezpečí, že všetky analyzované látky budú separované s minimálnym rozlíšením 1,3 (okrem 2-metylbután-1-olu a 3-metylbután-1-olu).

8.4. Kalibrácia

Kalibrácia by sa mala skontrolovať nasledujúcim postupom. Zabezpečte, aby bola odozva lineárna takým spôsobom, že postupne za sebou analyzujete trikrát každý zo štandardných roztokov používaných na kontrolu linearity (5.14.6), ktorý obsahuje vnútorný štandard (IS). Z plôch alebo výšok píkov, ktoré nameral integrátor pre každý vstreknutý roztok, vypočítajte pre každú spoluvznikajúcu zložku (kogener) pomer R a nakreslite grafický priebeh závislosti R od pomeru koncentrácie spoluvznikajúcej zložky ku koncentrácii vnútorného štandardu (IS), C. Mali by ste získať lineárny grafický priebeh s korelačným koeficientom najmenej 0,99.

$$R = \frac{\text{Plocha alebo výška píku spoluvznikajúcej zložky}}{\text{Plocha alebo výška píku vnútorného štandardu}}$$

$$C = \frac{\text{Koncentrácia spoluvznikajúcej zložky } (\mu g / g)}{\text{Koncentrácia vnútorného štandardu } (\mu g / g)}$$

8.5. Určenie (analýza)

Vstreknite štandardný roztok C (5.14.3) a 2 štandardné roztoky používané na kontrolu kvality (5.14.7). Potom pokračujte neznámymi vzorkami (pripravenými podľa bodov 8.1 a 8.2), pričom po každých 10 vzorkách vstreknite jeden štandardný roztok používaný na kontrolu kvality, čím zabezpečíte analytickú stabilitu. Po každých 5 vzorkách vstreknite jeden štandardný roztok C (5.14.3).

▼B

9. **Výpočet**

Je možné použiť automatizovaný systém spracovania údajov za predpokladu, že údaje možno kontrolovať na základe ďalej uvedených princípov.

Merajte buď plochy, alebo výšky píkov spoluvznikajúcej zložky a píky vnútorných štandardov.

9.1. Výpočet faktora odozvy.

Z chromatogramu štandardného roztoku C (5.14.3) vypočítajte z rovnice (1) faktory odozvy pre každú spoluvznikajúcu zložku.

$$(1)\ \text{Faktor odozvy} = \frac{\text{Plocha alebo výška píku IS}}{\text{Plocha alebo výška píku spoluvznik. zložky}} \times \frac{\text{Konc. spoluvznik. zložky (µg/g)}}{\text{Konc. IS (µg/g)}}$$

kde

IS = vnútorný štandard

Konc.spoluvznik.zložky = koncentrácia spoluvznikajúcej zložky v roztoku C (5.14.3)

Konc. IS = koncentrácia vnútorného štandardu v roztoku C (5.14.3)

9.1.2. Analýza vzorky

Z nasledovnej rovnice (2) vypočítajte koncentráciu každej spoluvznikajúcej zložky vo vzorkách.

$$\frac{\text{Plocha alebo výška píku spoluvznikajúcej zložky}}{\text{Plocha alebo výška píku IS}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{M_{VZORKA}\ (g)} \times \text{Konc. IS (µg / g)} \times RF$$

kde

M_{VZORKA} = hmotnosť vzorky (8.1.2)

M_{IS} = hmotnosť vnútorného štandardu (8.1.3);

Konc. IS = koncentrácia vnútorného štandardu v roztoku E (5.14.5);

RF = faktor odozvy vypočítaný z rovnice (1).

9.1.3. Analýza štandardného roztoku používaného na kontrolu kvality (QC)

Z ďalej uvedenej rovnice (3) vypočítajte percento výťažnosti cieľovej hodnoty každej spoluvznikajúcej zložky v štandardoch používaných pre kontrolu kvality (QC) (5.14.7):

$$(3)\ \%\ \text{obnovy vzorky QC} = \frac{\text{koncentrácia analyzovanej látky v štandarde QC}}{\text{koncentrácia analyzovanej látky v roztoku D}} \times 100$$

Koncentrácia analyzovanej látky v štandarde používanom na kontrolu kvality sa vypočíta z vyššie uvedených rovníc (1) a (2).

9.2. Záverečná prezentácia výsledkov

Pomocou rovnice (4) sa výsledky prevedú z jednotiek µg/g na g na 100 litrov absolútneho alkoholu:

(4) Koncentrácia v g na liter absolútneho alkoholu =

Koncentrácia (µg/g) x ρ x 10/(obsah etanolu v (% obj.) x 1 000)

kde ρ = hustota v kg/m^3.

Výsledky sa uvádzajú na tri platné číslice a maximálne jedno desatinné miesto, napr. 11,4 g na 100 litrov absolútneho alkoholu.

10. **Zabezpečenie kvality a kontrola kvality (používaná pre validovanú metódu)**

Z vyššie uvedenej rovnice (2) vypočítajte koncentráciu každej spoluvznikajúcej zložky v štandardných roztokoch používaných na kontrolu kvality, ktoré boli pripravené postupom popísaným v bodoch 8.1.1 až 8.1.4. Z rovnice (3) vypočítajte percento výťažnosti cieľovej hodnoty.

▼B

Ak sú analyzované výsledky pre každú spoluvznikajúcu zložku v rozmedzí ± 10 % od ich teoretických hodnôt, je možné pokračovať v analýze. Ak nie, mala by sa vyšetriť príčina nepresnosti a vykonať vhodné nápravné opatrenia.

11. **Pracovné charakteristiky metódy (presnosť)**

Štatistické výsledky medzilaboratórnej porovnávacej skúšky: ďalej uvedené tabuľky obsahujú hodnoty pre tieto zlúčeniny: etanal, etylacetát, celková koncentrácia etanalu, metanol, bután-2-ol, propán-1-ol, bután-1-ol, 2-metyl-propán-1-ol, 2-metyl-bután-1-ol, 3-metyl-bután-1-ol.

Nasledovné údaje boli získané z medzinárodnej porovnávacej štúdie metódy, ktorá bola vypracovaná podľa medzinárodne odsúhlasených postupov.

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	etanal

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	28	26	27	27	28
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	2	4	3	3	2
Počet akceptovaných výsledkov	56	52	54	54	56
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8 (*)	28,6 52,2 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	etylcetát

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	24	24	25	24	24

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	2	2	1	2	2
Počet akceptovaných výsledkov	48	48	50	48	48
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,22	6,6
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	acetál

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	20	21	22	17	21
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	4	3	2	4	3
Počet akceptovaných výsledkov	40	42	44	34	42
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60 (*)	15,1 28,3 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997

▼B

Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	celková koncentrácia etanalu

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	23	19	22	21	22
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	1	5	2	3	2
Počet akceptovaných výsledkov	46	38	44	42	44
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8 (*)	32,7 61,8 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	metanol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	26	27	27	28	25
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	4	3	3	1	4
Počet akceptovaných výsledkov	52	54	54	56	50
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	4,4	27	22	1,5	1,3
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	4
Analyzovaná látka	bután-2-ol

Vzorky	A	B	C	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	21	27	29	22
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	4	3	1	3
Počet akceptovaných výsledkov	42	54	58	44
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	0,40	2,2	0,87	0,64
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
E Rum; rozdelené úrovne (split levels) (*).

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	propán-1-ol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	29	27	27	29	29
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	2	4	3	2	2
Počet akceptovaných výsledkov	58	54	54	58	58
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	3,0	24	3,6	2,3	3,3

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	propán-1-ol

Vzorky	A	B	C
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	20	22	22
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	4	4	6
Počet akceptovaných výsledkov	40	44	44
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	3,79	5,57	7,54
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	0,43	0,20	0,43
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	2-metylpropán-1-ol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	28	31	30	26	25

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	3	0	1	5	6
Počet akceptovaných výsledkov	56	62	60	52	50
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8 (*)	133,87 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	2-metyl-bután-1-ol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	25	26	285	27	25
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	3	2	3	1	2
Počet akceptovaných výsledkov	50	52	50	54	50
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1	39,5
				45,2 (*)	61,5 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

▼B

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	1 997
Počet laboratórií	32
Počet vzoriek	5
Analyzovaná látka	3-metyl-bután-1-ol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	23	23	24	27	21
Počet laboratórií, ktorých hodnoty sa príliš odlišovali	5	5	4	1	6
Počet akceptovaných výsledkov	46	46	48	54	42
Stredná hodnota($\bar{x}$)µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) µg/g.	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Limit opakovateľnosti (r) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Limit reprodukovateľnosti (R) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Typy vzoriek
A Ovocná pálenka (brandy); slepé duplikáty.
B Griotka; slepé duplikáty.
C Grappa; slepé duplikáty.
D Whisky; rozdelené úrovne (split levels) (*).
E Rum; rozdelené úrovne (*).

▼M1

V. ANETOL. STANOVENIE TRANS-ANETOLU V LIEHOVINÁCH PLYNOVOU CHROMATOGRAFIOU

1. **Pôsobnosť**

Táto metóda je vhodná pre stanovenie trans-anetolu v liehovinách s príchuťou anízu s použitím kapilárnej plynovej chromatografie.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987 Voda pre použitie v analytickom laboratóriu – Špecifikácie a skúšobné metódy.

3. **Princíp**

Koncentrácia trans-anetolu v liehu sa určuje plynovou chromatografiou (PC). Do skúšobnej vzorky a do referenčného roztoku trans-anetolu známej koncentrácie sa pridá rovnaké množstvo vnútorného štandardu, t. j. 4-alylanizolu (estragolu), ak nie je prirodzene prítomný vo vzorke, ktoré sa potom zriedia so 45 % roztokom etanolu a vstrekujú priamo do systému PC. Pre likéry, ktoré obsahujú veľké množstvo cukru, je pred prípravou vzorky a analýzou potrebná extrakcia.

4. **Činidlá a materiály**

Počas analýzy používame len činidlá s čistotou minimálne 98 %. Mala by sa použiť voda s minimálnou triedou 3, tak ako ju definuje ISO 3696.

Referenčné chemikálie by sa mali skladovať v chlade (pri 4 °C), chrániť pred svetlom, v hliníkových zásobníkoch alebo vo farebných (tmavých) sklených reagenčných fľašiach. Zátky by mali byť vybavené tesnením, najvýhodnejšie hliníkovým. Pred použitím bude treba previesť trans-anetol z jeho kryštalického stavu do stavu „kvapalného“, v takom prípade teplota nesmie nikdy prekročiť 35 °C.

4.1. 96 % obj. etanol (CAS 64-17-5)

4.2. 1-metoxy-4-(1-propenyl) benzén, (trans-anetol) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-alylanizol, (estragol) (CAS 140-67-0), navrhovaný vnútorný štandard (IS)

4.4. Etanol 45 % obj.

Pridajte 560 g destilovanej vody do 378 g etanolu 96 % obj.

4.5. Príprava roztokov štandardu

Všetky roztoky štandardu treba skladovať pri teplote miestnosti (15 až 35 °C) chránené pred svetlom, v hliníkových zásobníkoch alebo vo farebných (tmavých) sklených reagenčných fľašiach. Zátky by mali byť vybavené prednostne hliníkovým tesnením.

Trans-anetol a 4-alylanizol sú prakticky nerozpustné vo vode a preto ich treba pred pridaním 45 % etanolu (4.1.) rozpustiť v troške 96 % etanolu (4.4.).

Zásobné roztoky sa musia čerstvo pripraviť každý týždeň.

4.5.1. Roztok štandardu A

Roztok štandardu trans-anetolu (koncentrácia: 2 g/l)

Odvážte 40 mg trans-anetolu (4.2.) v 20 ml odmernej banke (alebo 400 mg v 200 ml atď.). Pridajte trošku 96 % obj. etanolu (4.1.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

4.5.2. Roztok vnútorného štandardu B

Zásobný roztok vnútorného štandardu, t. j. estragolu (koncentrácia: 2 g/l)

Odvážte 40 mg estragolu (4.3.) v 20 ml odmernej banke (alebo 400 mg v 200 ml atď.). Pridajte trošku 96 % obj. etanolu (4.1.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

▼M1

4.5.3. Roztoky, ktoré sa používajú na kontrolu linearity odozvy plamenného ionizačného detektoru (PID)

Linearita odozvy PID pre analýzu sa musí skontrolovať berúc do úvahy rozsah koncentrácií trans-anetolu v liehovinách od 0 g/l až do 2,5 g/l. V procese analýzy neznáme vzorky liehovín, ktoré sa majú analyzovať, sa zrieďujú 10 násobne (8.3.). Pre podmienky analýzy opísanej v tejto metóde sa pripravia zásobné roztoky zodpovedajúce koncentráciám 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 a 0,25 g/l trans-anetolu vo vzorke, ktorá sa má analyzovať, takto: vezmite 0,5, 1,5, 2 a 2,5 ml zásobného roztoku A (4.5.1) a pipetujte do oddelených 20 ml odmerných baniek; pipetujte do každej banky 2 ml roztoku vnútorného štandardu B (4.5.2.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

Ako slepé vzorky (8.4) sa použijú roztoky s 0 g/l.

4.5.4. Roztok štandardu C

Vezmite 2 ml roztoku štandardu A (4.5.1.) a pipetujte do 20 ml odmernej banky, potom pridajte 2 ml roztoku vnútorného štandardu B (4.5.2.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

5. **Prístroj a zariadenie**

5.1. Kapilárny plynový chromatograf vybavený plamenným ionizačným detektorom (PID) a integrátorom alebo iným zariadením na spracovanie údajov pre meranie výšky píku alebo plochy a s automatickým alebo manuálnym dávkovačom.

5.2. Injektor split/splitless

5.3. Kapilárna kolóna, napríklad:

Dĺžka: 50 m

Vnútorný priemer: 0,32 mm

Hrúbka filmu: 0,2 μm

Stacionárna fáza: FFAP – modifikovaný TPA polyetylénglykol sieťový, porézny polymér.

5.4. Bežné laboratórne zariadenie: A stupeň kvality odmerných sklených nádob, analytické váhy (presnosť ± 0,1 mg).

6. **Chromatografické podmienky**

Typ kolóny a rozmery a podmienky chromatografie by mali byť také, aby anetol a vnútorný štandard boli oddelené jeden od druhého a bez akýchkoľvek rušiacich látok. Typické podmienky pre kolónu sú uvedené ako príklad v 5.3.:

6.1. Nosný plyn: analytické hélium

6.2. Prietok: 2 ml/min

6.3. Teplota injektora: 250 °C

6.4. Teplota detektora: 250 °C

6.5. Teplotné podmienky pece: izotermický režim, 180 °C, čas chodu 10 minút

6.6. Vstrekovaný objem: 1 μl, split 1:40

7. **Vzorky**

Vzorky by sa mali skladovať pri teplote miestnosti, chránené pred svetlom a chladom.

8. **Postup**

8.1. Kontrola vzorky na estragol

Aby sme zabezpečili, že vo vzorke nie je prítomný žiadny estragol, musí sa vykonať analýza slepej vzorky bez pridania vnútorného štandardu. Ak je estragol prirodzene prítomný, potom sa musí vybrať iný vnútorný štandard (napríklad mentol).

▼M1

Pipetujte 2 ml vzorky do 20 ml odmernej banky a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

8.2. Príprava neznámych vzoriek

Pipetujte 2 ml vzorky do 20 ml odmernej banky, potom pridajte 2 ml roztoku vnútorného štandardu B (4.5.2.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

8.3. Slepý pokus

Pipetujte 2 ml roztoku vnútorného štandardu B (4.5.2.) do 20 ml odmernej banky a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

8.4. Skúška linearity

Pred začatím analýzy by sa mala skontrolovať linearita odozvy PID postupne analýzou v trikrát opakovaných nástrekoch každého z roztokov štandardu linearity (4.5.3.).

Z plôch píkov alebo z výšok píkov integrátora pre každý nástrek zostrojte graf koncentrácii ich materských roztokov (g/l) voči pomeru R.

R = výška píku alebo plocha trans-anetolu delená výškou píku alebo plochou estragolu.

Graf by mal byť lineárny.

8.5. Stanovenie

Vstreknite roztok slepej vzorky (8.3.), po ktorom nasleduje roztok štandardu C (4.5.4.), po ktorom nasleduje jeden z roztokov štandardu pre určenie linearity (4.5.3.), ktorý sa použije ako kontrolná vzorka kvality (táto sa môže vybrať ako referenčná k predpokladanej koncentrácii trans-anetolu v neznámej vzorke), po ktorej nasleduje päť neznámych vzoriek (8.2.); nastreknite štandard pre kontrolu linearity (kontrola kvality) po každých piatich neznámych vzorkách, aby ste zabezpečili analytickú stabilitu.

9. **Výpočet faktoru odozvy**

Zmerajte buď plochy píkov (použitím integrátora alebo inej data stanice) alebo výšky píkov (ručná integrácia) pre píky trans-anetolu a vnútorného štandardu.

9.1. Výpočet faktoru odozvy (RF_i)

Faktor odozvy sa vypočíta takto:

$RF_i = (C_i/\text{plocha alebo výška}_i)\cdot(\text{plocha alebo výška}_{is}/C_{is})$

kde:

C_i koncentrácia trans-anetolu v roztoku štandardu A (4.5.1),

C_{is} koncentrácia vnútorného štandardu v roztoku štandardu B (4.5.2),

plocha_i je plocha píku (alebo výška píku) trans-anetolu,

plocha_{is} je plocha píku (alebo výška píku) vnútorného štandardu,

RF_i sa vypočíta z piatich vzoriek roztoku C (4.5.4.)

9.2. Analýza linearity odozvy analyzovaných roztokov

Vstreknite roztoky (4.5.3.) pre skúšku linearity odozvy.

9.3. Analýza vzorky

Vstreknite neznámy roztok vzorky (8.2.).

10. **Výpočet výsledkov**

Vzorec pre výpočet koncentrácie trans-anetolu je nasledujúci:

$c_i = C_{is} \bullet(\text{plocha alebo výška}_i/\text{plocha alebo výška}_{is})\bullet RF_i$

kde:

c_i je neznáma koncentrácia trans-anetolu,

▼M1

C_{is}	je koncentrácia vnútorného štandardu v neznámej vzorke (4.5.2)
plocha alebo výška$_i$	je plocha píku alebo výška píku trans-anetolu,
plocha alebo výška$_{is}$	je plocha píku alebo výška píku vnútorného štandaru
RF_i	je koeficient odozvy (vypočítaný ako 9.1.).

Koncentrácia trans-anetolu je vyjadrená v g/l na jedno desatinné miesto.

11. **Zabezpečovanie a kontrola kvality**

Chromatogramy musia byť také, aby anetol a vnútorný štandard boli oddelené jeden od druhého a od akýchkoľvek rušiacich látok. Hodnota RF_i sa vypočíta z výsledkov pre päť nástrekov roztoku C (4.5.4.). Ak koeficient variácie (CV % = (štandardná odchýlka/ stredná) * 100)) je v rozsahu plus alebo mínus 1 %, priemerná hodnota RF_i je prijateľná.

Uvedený výpočet treba použiť na výpočet koncentrácie trans-anetolu vo vzorke vybratej pre kontrolu kvality z roztokov na kontrolu linearity (4.5.3.).

Ak stredné vypočítané výsledky z analýzy roztoku linearity vybratého pre vzorku vnútornej kontroly kvality (IQC) sú v rozsahu plus alebo mínus 2,5 % ich teoretickej hodnoty, potom výsledky pre neznáme vzorky môžu byť prijateľné.

12. **Úprava vzorky liehoviny, ktorá obsahuje veľké množstvo cukru a so vzorkou likéru pred analýzou PC**

Extrakcia alkoholu z liehového nápoja obsahujúceho veľké množstvo cukru tak, aby bol vhodný na stanovenie koncentrácie trans-anetolu použitím kapilárnej plynovej chromatografie.

12.1. Princíp

Odoberie sa podiel vzorky likéru a pridá sa k nej vnútorný štandard, v koncentrácii podobnej stanovovanej zložke (trans-anetol) v likéri. K tomuto sa pridá dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného a bezvodý síran amónny. Výsledná zmes sa dobre zamieša a schladí, vytvoria sa dve vrstvy a horná alkoholická vrstva sa odstráni. Odoberie sa podiel tejto alkoholickej vrstvy a zriedi 45 % roztokom etanolu (4.4.) (Poznámka: v tomto stupni sa žiadny vnútorný štandard nepridáva, pretože už bol pridaný). Výsledný roztok sa analyzuje plynovou chromatografiou.

12.2. Činidlá a materiály

Počas extrakcie používajte len činidlá s čistotou viac než 99 %.

12.2.1. Síran amónny, bezvodý (CAS 7783-20-2)

12.2.2. Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (CAS 10039-32-4).

12.3. Prístroj a zariadenia

Kužeľové banky, deliace banky, chladnička.

12.4. Postup

12.4.1. Kontrola vzorky na estragol

Na zabezpečenie, aby vo vzorke nebol prirodzene prítomný žiadny estragol, bolo by potrebné vykonať extrakciu slepej vzorky (12.6.2.) a analýzu urobiť bez pridania vnútorného štandardu. Ak je estragol prirodzene prítomný, potom sa musí vybrať iný vnútorný štandard.

12.4.2. Extrakcia

Pipetujte 5 ml 96 % etanolu (4.1.) do kužeľovej banky, navážte do tejto banky 50 mg vnútorného štandardu (4.3.) a pridajte 50 ml vzorky. Pridajte 12 g síranu amónneho, bezvodého (12.2.1.) a 8,6 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného (12.2.2). Zazátkujte kužeľovú banku.

Traste bankou aspoň 30 minút. Môžete použiť aj mechanickú trepačku, ale nie magnetickú miešaciu tyčinku pokrytú teflónom,

▼M1

pretože teflón by mohol absorbovať časť stanovovanej zložky. Sledujte, až kým sa pridané soli úplne nerozpustia.

Umiestnite zazátkovanú banku do chladničky (T < 5°C) na minimálne dve hodiny.

Po tomto čase by sa mali vytvoriť dve rozdielne kvapalné vrstvy a pevný zvyšok. Alkoholová vrstva by mala byť číra; ak nie je, dajte banku znovu do chladničky, až kým sa nedosiahne číre oddelenie.

Keď je alkoholová vrstva číra, opatrne odoberte podiel (napr. 10 ml) bez porušenia vodnej vrstvy, dajte do vialky z tmavého skla a bezpečne uzatvorte.

12.4.3. Príprava extrahovanej vzorky, ktorá sa má analyzovať

Nechajte extrakt (12.4.2.) tak, aby dosiahol teplotu miestnosti.

Vezmite 2 ml alkoholovej vrstvy temperovanej vzorky a pipetujte do 20 ml odmernej banky, doplňte po značku 45 % etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

12.5. Stanovenie

Dodržujte postup opísaný v 8.5.

12.6. Výpočet výsledkov

Použite nasledujúci vzorec na výpočet výsledkov:

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

kde:

m_i je hmotnosť (v mg) odobratého (12.4.2.) vnútorného štandardu (4.3),

V je objem neznámej vozrky (50 ml),

RF_i je faktor odozvy (9.1)

plocha_i je plocha píku trans-anetolu,

plocha_{is} je plocha píku vnútorného štandardu.

Výsledky sú vyjadrené v g/l na jedno desatinné miesto.

12.7. Zabezpečovanie a kontrola kvality

Dodržujte postup opísaný v 11.

13. **Charakteristika vybraných metrologických parametrov metódy (presnosť)**

Štatistické výsledky medzilaboratórnej skúšky:

nasledujúce tabuľky uvádzajú hodnoty pre anetol.

Tieto údaje boli získané z medzinárodnej štúdie vybraných metrologických parametrov metódy vykonanej medzinárodne dohodnutým postupom.

Rok medzilaboratórnej skúšky	1 998
Počet laboratórií	16
Počet vzoriek	10
Skúmaná látka	ane tol

Pastis:

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchýlených výsledkov	15	15	15	13	16	16
Počet odchýlených výsledkov (laboratóriá)	1	1	1	3	–	–
Počet prijatelných výsledkov	30	30	30	26	16	16

▼**M1**

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Stredná hodnota g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	–	–
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	–	–
Limit opakovateľnosti (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	–	–
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Typy vzoriek:

A pastis, slepé duplikáty

B pastis, slepé duplikáty

C pastis, slepé duplikáty

D pastis, slepé duplikáty

E pastis, jednotlivé duplikáty

F pastis, jednotlivé duplikáty

Ostatné liehové nápoje s príchuťou anízu:

Vzorky	G	H	I	J
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchýlených výsledkov	16	14	14	14
Počet odchýlených výsledkov (laboratóriá)	–	2	1	1
Počet prijateľných výsledkov	32	28	28	28
Stredná hodnota g/l	0,778 0,530*	1,742	0,351	0,599
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Limit opakovateľnosti (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Typy vzoriek:

G ouzo, delené hladiny*

H aníz slepé duplikáty

I likér s príchuťou anízu, duplikáty

J likér s príchuťou anízu, duplikáty

▼M1

VI. GLYCYRIZÍNOVÁ KYSELINA. STANOVENIE GLYCYRIZÍNOVEJ KYSELINY POUŽITÍM VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE

1. **Rozsah**

Táto metóda je vhodná na stanovenie glycyrizínovej kyseliny v liehových nápojoch s príchuťou anízu použitím vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (VUKC). Nariadenie (EHS) č. 1576/89 určuje, aby akákoľvek liehovina s príchuťou anízu, ktorá sa volá „pastis“, obsahovala glycyrizínovú kyselinu v rozmedzí 0,05 až 0,5 g/l.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987 Voda pre použitie v analytickom laboratóriu – Špecifikácie a skúšobné metódy.

3. **Princíp**

Koncentrácia glycyrizínovej kyseliny sa určuje použitím vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (VUKC) s UV detekciou. Roztok štandardu a skúšobná vzorka sa prefiltrujú a oddelene vstrekujú do systému VUKC.

4. **Činidlá a materiály**

Počas analýzy používajte len činidlá s triedou čistoty pre VUKC, absolútny etanol a vodu v triede 3, ako ju definuje ISO 3696.

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

4.2. Glycyrizinát amónny, $C_{42}\ H_{62}\ O_{16}.NH_3$ (amónna soľ kyseliny glycyrizínovej)

(pomerná molekulová hmotnosť 839,98) (CAS 53956-04-0), čistota minimálne 90 %

kyselina glycyrizínová (pomerná molekulová hmotnosť 822,94)

4.3. Ľadová kyselina octová, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

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

4.5. Etanol 50 % obj.

Na 1 000 ml pri 20°C je potrebné:

— 96 % obj. etanol (4.1.): 521 ml

— voda (2.0.): 511 ml.

4.6. Príprava elučných roztokov pre VUKC

4.6.1. Elučné rozpúšťadlo A (príklad)

80 častí (objemových) vody (2.0.)

20 častí (objemových) kyseliny octovej (4.3.).

Elučné rozpúšťadlo odplyňujte päť minút.

Poznámka: Ak použitá voda nebola mikrofiltrovaná, odporúča sa filtrovať pripravené elučné rozpúšťadlo na filtri pre organické rozpúšťadlá s veľkosťou pórov menších alebo rovných 0,45 μm.

4.6.2. Elučné rozpúšťadlo B

Metanol (4.4.).

4.7. Príprava roztokov štandardu

Všetky roztoky štandardu musia byť po dvoch mesiacoch čerstvo pripravené.

4.7.1. Referenčný roztok C

Navážte do odmernej banky s presnosťou na 0,1 mg, 25 mg glycyrizinátu amónneho (4.2.) v 100 ml odmernej banke. Pridajte trochu 50 % obj. etanolu (4.5.) a rozpustite glycyrizinát amónny. Keď je rozpustený, doplňte po značku s 50 % obj. etanolom (4.5.).

Prefiltrujte cez filter pre organické rozpúšťadlá.

▼M1

4.7.2. Roztoky štandardu používané na kontrolu linearity odozvy prístrojového vybavenia.

1,0 g/l zásobného roztoku sa pripraví navážením 100 mg glycyrizinátu amónneho s presnosťou na 0,1 mg do 100 ml odmernej banky. Pridajte trochu 50 % obj. etanolu (4.5.) a nechajte rozpustiť glycyrizinát amónny. Keď je rozpustený, doplňte po značku s 50 % obj. etanolom (4.5.).

Pripravia sa minimálne štyri ďalšie roztoky zodpovedajúce 0,05, 0,1, 0,25 a 0,5 g/l glycyrizinátu amónneho pipetovaním príslušných 5 ml, 10 ml, 25 ml a 50 ml 1,0 g/l zásobného roztoku do jednotlivých 100 ml odmerných baniek. Potom doplňte po značku s 50 % obj. etanolom (4.5.), dôkladne zamiešajte.

Prefiltrujte všetky roztoky cez filter pre organické rozpúšťadlá.

5. **Prístroje a zariadenie**

5.1. Deliaci systém

5.1.1. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf.

5.1.2. Čerpací systém umožňujúci dosiahnuť a udržiavať konštantnú alebo naprogramovanú rýchlosť prietoku s veľkou presnosťou.

5.1.3. UV spektrofotometrický detekčný systém: treba nastaviť na 254 nm.

5.1.4. Zariadenie na odplynenie eluenta.

5.2. Integrátor alebo zapisovač, ktoré sú kompatibilné so zvyškom systému.

5.3. Kolóna (príklad):

Materiál: nehrdzavejúca oceľ alebo sklo

Vnútorný priemer: 4 až 5 mm

Dĺžka: 100 až 250 mm

Stacionárna fáza: sieťový oxid kremičitý s (výhodnejší je sférický) oktadecyl funkčnou skupinou (C18), maximálna veľkosť častíc: 5 μm.

5.4. Laboratórne zariadenie

5.4.1. Analytické váhy s presnosťou 0,1 mg

5.4.2. Analytické odmerné nádoby triedy presnosti A

5.4.3. Mikromembránová filtračná zostava pre malé objemy

6. **Chromatografické podmienky**

6.1. Elučné charakteristiky: (príklad)

— prietoková rýchlosť: 1 ml/min,

— rozpúšťadlo A = 30 %,

— rozpúšťadlo B = 70 %.

6.2. Detekcia:

— UV = 254 nm

7. **Postup**

7.1. Príprava liehovej vzorky

Prefiltrujte, ak treba, cez filter na organické rozpúšťadlá (priemer pórov: 0,45 μm).

7.2. Stanovenie

Len čo sú chromatografické podmienky stabilizované:

— vstreknite 20 μl referenčného roztoku C (4.7.1.),

— vstreknite 20 μl roztoku vzorky,

▼M1

— porovnajte tieto dva chromatogramy. Určite píky glycyrizínovej kyseliny z ich retenčných časov. Zmerajte ich plochy (alebo výšky) a vypočítajte koncentráciu v g/l na dve desatinné čísla s použitím nasledujúcej rovnice:

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

kde:

c je koncentrácia v g/l glycyrizínovej kyseliny v liehu, ktorý bol analyzovaný,

C je koncentrịcia v g/l glycyriziṇtu amónneho v referenčnom roztoku,

H je plocha (alebo výška) píku glycyrizínovej kyseliny liehu, ktorý analyzujeme,

H je plocha (alebo vẓka) pḳku glycyrizḳnovej kyseliny referenčného roztoku,

P je čistota referenčného glycyrizinátu amónneho (v %),

823 je hmota jedného mólu glycyrizínovej kyseliny,

840 je hmota jedného mólu glycyrizinátu amónneho.

8. **Charakteristika vybraných metrologických parametrov metódy (presnosť)**

Štatistické výsledky medzilaboratórnej skúšky:

nasledujúca tabuľka uvádza hodnoty pre glycyrizínovú kyselinu.

Nasledujúce údaje boli získané z medzinárodnej štúdie metrologických parametrov metódy medzinárodne dohodnutým postupom.

Rok medzilaboratórnej skúšky	1 998
Počet laboratórií	16
Počet vzoriek	5
Skúmaná látka	g lyc yri zín ová ky sel ina

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchýlených výsledkov	13	14	15	16	16
Počet odchýlených výsledkov (laboratóriá)	3	2	1	–	–
Počet prijatých výsledkov	26	28	30	32	32
Stredná hodnota g/l	0,046	0,092 *0,099	0,089	0,249	0,493
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Limit opakovateľnosti (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Typy vzoriek:

A pastis, slepé duplikáty

B pastis, delené hladiny*

▼**M1**

C pastis, slepé duplikáty

D pastis, slepé duplikáty

E pastis, jednotlivé duplikáty

▼M1

VII. **CHALKÓNY. VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA. METÓDA NA OVERENIE PRÍTOMNOSTI CHALKÓNOV V PASTISE**

1. **Rozsah**

Táto metóda je vhodná na zistenie, či sú chalkóny prítomné v nápojoch s príchuťou anízu, alebo nie. Chalkóny sú prírodné farbivá zo skupiny flavonoidov, ktoré sú prítomné v koreni sladovky hladkoplodej (*Glycyrrhiza glabra*).

Liehovina s príchuťou anízu, ktorá sa volá „pastis“, musí obsahovať chalkóny (nariadenie (EHS) č. 1576/89).

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987, Voda pre použitie v analytickom laboratóriu – Špecifikácie a skúšobné metódy.

3. **Princíp**

Pripraví sa referenčný roztok extraktu zo sladovky hladkoplodej. Prítomnosť alebo neprítomnosť chalkónov sa určí pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (VUKC) s UV detekciou.

4. **Činidlá a materiály**

Počas analýzy používajte len činidlá s čistotou triedy pre VUKC. Etanol 96 % obj. Vodu treba použiť len triedy čistoty 3, ako ju definuje ISO 3696.

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

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

4.3. Referenčná látka: sladovka hladkoplodá (*Glycyrrhiza glabra*), „sladké drievko“.

Hrubo zomleté korene sladovky hladkoplodej (*Glycyrrhiza glabra*). Priemerné rozmery tyčinkovitých častí: dĺžka: 10 až 15 mm, hrúbka 1 až 3 mm.

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

4.5. Ľadová kyselina octová, CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.6. Príprava roztokov

4.6.1. Etanol 50 % obj.

Na 1 000 ml pri 20 °C treba:

— Etanol 96 % obj. (4.1.): 521 ml,

— voda (2.0.): 511 ml.

4.6.2. Rozpúšťadlo A: acetonitril

Acetonitril (4.2.) s analytickou čistotou pre VUKC.

Odplyňte.

4.6.3. Rozpúšťadlo B: 0,1 M octan sodný, tlmivý roztok, pH 4,66.

Odvážte 8,203 g octanu sodného (4.4.), pridajte 6,005 g ľadovej kyseliny octovej (4.5.) a doplňte vodou (2) odmernú banku na 1 000 ml.

5. **Príprava referenčného extraktu z (*Glycyrrhiza glabra* (4.3)**

5.1. Odvážte 10 g zomletého koreňa sladovky hladkoplodej (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3.) a vložte do destilačnej banky s guľatým dnom:

— pridajte 100 ml 50 % obj. etanolu (4.6.1.),

— varte refluxom jednu hodinu,

— prefiltrujte,

— odložte filtrát bokom na neskoršie použitie.

5.2. Získanie extraktu sladovky z filtra:

— vložte ho do banky s guľatým dnom,

— pridajte 100 ml 50 % obj. etanolu (4.6.1.),

▼M1

— varte refluxom jednu hodinu,

— prefiltrujte. Odložte filtrát bokom na neskoršie použitie.

5.3. Extrakcia koreňa sladovky sa musí vykonať trikrát po sebe.

5.4. Spojte tieto tri filtráty.

5.5. Odparte rozpúšťadlo (z 5.4.) na rotačnom odparovacom zariadení.

5.6. Rozpustite zvyšok (z 5.5.) so 100 ml 50 % obj. etanolu (4.6.1.).

6. **Prístroje a zariadenie**

6.1. Deliaci systém.

6.1.1. Vysoko účinná kvapalinová chromatografia.

6.1.2. Čerpací systém umožňujúci dosiahnuť a udržiavať konštantnú alebo naprogramovanú rýchlosť prietoku s veľkou presnosťou.

6.1.3. UV/VIS spektrofotometrický detekčný systém, ktorý môže byť nastavený na 254 a 375 nm.

6.1.4. Zariadenie na odplyňovanie rozpúšťadla:

6.1.5. Kolónový termostat, ktorý sa dá nastaviť na teplotu 40 ± 0,1°C.

6.2. Integrátor alebo zapisovač, ktoré sú kompatibilné so zvyškom deliaceho systému.

6.3. Kolóna

Materiál: nehrdzavejúca oceľ alebo sklo

Vnútorný priemer: 4 až 5 mm

Stacionárna fáza: sieťový oxid kremičitý s oktadecyl funkčnou skupinou (C18), veľkosť častíc: maximálne 5 μm (sieťová fáza).

6.4. Bežné laboratórne zariadenie zahŕňa:

6.4.1. analytické váhy s presnosťou ± 0,1 mg;

6.4.2 destilačný prístroj s refluxným kondenzátorom skladajúci sa napr. z:

— 250 ml banky s guľatým dnom so štandardizovaným spojom so zábrusom,

— 30 cm dlhého refluxného kondenzátora a

— tepelného zdroja (treba sa vyhnúť akejkoľvek pyrogénnej reakcii v súvislosti s extrakčnou hmotou použitím príslušnej zostavy).

6.4.3. Zariadenie na rotačné odparovanie.

6.4.4. Filtračná zostava (t. j. Buchnerov lievik).

6.5. Chromatografické podmienky (príklad).

6.5.1. Elučné charakteristiky rozpúšťadiel A (4.6.2.) a B (4.6.3.):

— posun z 20/80 (v/v) na 50/50 (v/v) gradient počas 15 minút,

— posun z 50/50 (v/v) na 75/25 (v/v) gradient počas 5 minút,

— rovnaká elučná mohutnosť pri 75/25 (v/v) počas 5 minút,

— stabilizácia kolóny medzi nástrekmi,

— rovnaká elučná mohutnosť pri 20/80 (v/v) počas 5 minút.

6.5.2. Rýchlosť prietoku: 1 ml/min.

6.5.3. Nastavenia UV detektora:

tento detektor musí byť nastavený na 370 nm, aby detekoval prítomnosť chalkónov a potom na 254 nm, aby detekoval kyselinu glycyrizínovú.

▼M1

Poznámka:zmena vlnovej dĺžky (z 370 nm na 254 nm) sa musí vykonať 30 sekúnd pred začiatkom elúcie píku kyseliny glycyrizínovej.

7. **Postup**

7.1. Príprava vzorky liehu

Prefiltrujte cez filter pre organické rozpúšťadlá (priemer póru: 0,45 μm).

7.2. Príprava zvyškového extraktu sladovky (5.6.)

Zrieďte pred analýzou v pomere 1:10 s 50 % obj. etanolom (4.6.1.).

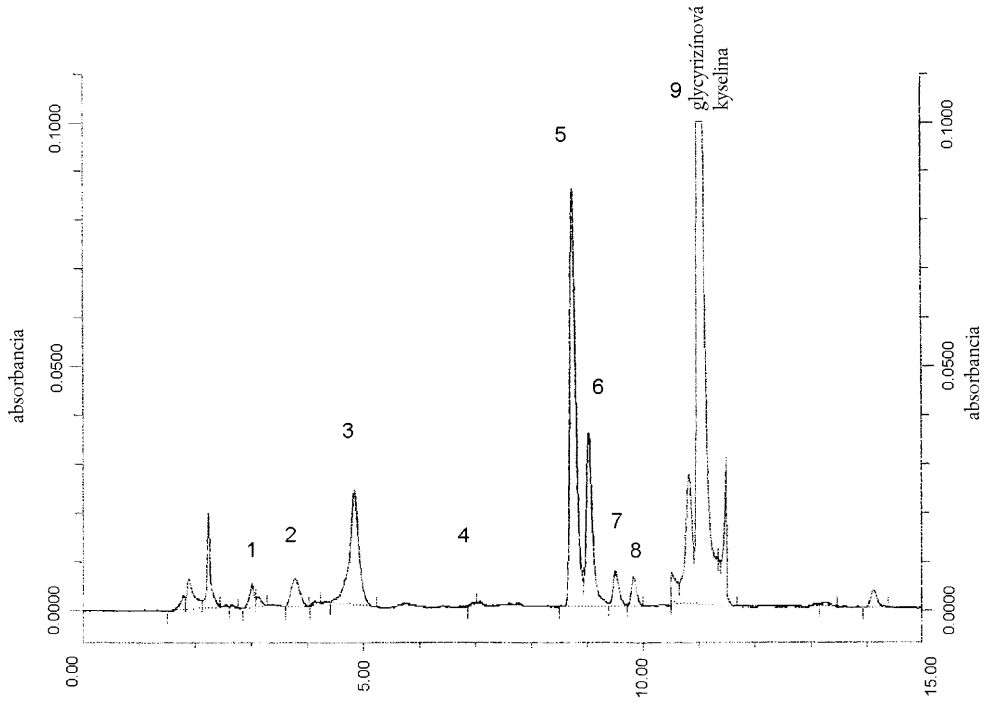
7.3. Stanovenie

7.3.1. Nastreknite 20 μl pripraveného extraktu sladovky (7.2.). Vykonajte analýzu za použitia chromatografických podmienok uvedených hore (6.5.).

7.3.2. Nastreknite 20 μl vzorky (7.1.) (anizovou príchuťou fortifikovanú vzorku liehu).Vykonajte unalýzu za použitia chromatografických podmienok opísaných vyššie (6.5.).

7.3.3. Porovnajte tieto dva chromatogramy. Musí byť veľká podobnosť medzi nimi vo výstupnej zóne chalkónu (počas detekcie pri 370 nm pri analytických podmienkach uvedených hore) (pozri obrázok 1).

8. **Charakteristický chromatogram pre pastis**



▼M1

9. **Charakteristika vybraných metrologických parametrov metódy (presnosť)**

Výsledky medzilaboratórnej skúšky:

nasledujúca tabuľka uvádza schopnosť metódy pre uznanie prítomnosti alebo neprítomnosti chalkónov v pastise a liehovinách s príchuťou anízu.

Nasledujúce údaje boli získané z medzinárodnej štúdie parametrov metódy vykonanej medzinárodne dohodnutým postupom.

Rok medzilaboratórnej skúšky	1 998
Počet laboratórií	14
Počet vzoriek	11
Skúmaná látka	ch alk óny

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchýlených výsledkov	14	14	14	14	14	13
Počet odchýlených výsledkov (laboratóriá)	–	–	–	–	–	1 (*)
Počet prijatých výsledkov	28	1	14	28	28	26
Počet výsledkov na prítomnosť chalkónov	28	14	14	0	28	0
Počet výsledkov na neprítomnosť chalkónov	0	0	0	28	0	26
Percento správnych výsledkov (%)	100	100	100	100	100	100

(*) rozporné výsledky medzi dvoma duplikátmi, poukazujúce na chybu vzorkovania

Vzorky	G	H	I	J	K
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchýlených výsledkov	14	14	14	14	14
Počet odchýlených výsledkov (laboratóriá)	–	–	–	–	–
Počet prijatých výsledkov	28	14	14	28	28
Počet výsledkov na prítomnosť chalkónov	0	0	0	0	0
Počet výsledkov na neprítomnosť chalkónov	28	14	14	28	28
Percento správnych výsledkov (%)	100	100	100	100	100

Typy vzoriek:

A pastis, slepé duplikáty,

B pastis, jediná vzorka,

C pastis, jediná vzorka,

D „pastis“ (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty,

E „pastis“ (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty,

F likér s prķchuou anķzu (neobsahujści chalkóny), slepé duplikáty,

G likér s príchuťou anžzu (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikıty,

H ouzo (neobsahujúce chalkóny), jediná vzorka,

I ouzo (neobsahujúce chalkóny), jediná vzorka,

J aníz (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty,

K „pastis“ (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty.

▼M1

IX. VAJEČNÝ ŽĹTOK. STANOVENIE VAJEČNÉHO ŽĹTKU V LIEHOVÝCH NÁPOJOCH – FOTOMETRICKÁ METÓDA

1. **Rozsah**

Táto metóda je vhodná na stanovenie vaječného žĺtka v rozmedzí 40 až 250 g/l vo vaječnom likéri alebo likéri s vajíčkom.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987 Voda pre použitie v analytickom laboratóriu – Špecifikácie a skúšobné metódy.

3. **Princíp**

V etanole rozpustné zlúčeniny obsahujúce fosfor, ktoré sa nachádzajú vo vaječnom žĺtku, sa extrahujú a skúšajú fotometricky ako komplex molybdenanu fosforečného.

4. **Činidlá a materiály**

4.1. Redestilovaná voda

4.2. Infuzóriová hlinka

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

4.4. Roztok 15 % octanu horečnatého (CAS 16674-78-5)

4.5. 10 % kyselina sírová (CAS 7664-93-9)

4.6. 1 N kyselina sírová

4.7. Roztok 0,16 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného (CAS 778-77-0), KH2PO4

4.8. Činidlo pre stanovenie forforečnanu:

rozpustite 20 g molybdenanu amónneho (CAS 12054-85-2), $(NH_4M_{o7}O_{24}.4H_20$ v 400 ml vody pri 50 °C;

v ďalšej nádobe rozpustite 1 g vanadičnanu amónneho (CAS 7803-55-6), NH4VO3 v 300 ml horúcej vody, nechajte ochladiť, potom pridajte 140 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej (CAS 7697-37-2). Spojte ochladené roztoky do 1 000 ml odmernej banky a doplňte po značku na 1 000 ml.

5. **Prístroje a zariadenie**

5.1. 100 ml kužeľová banka

5.2. Ultrazvukový kúpeľ (alebo magnetické miešadlo)

5.3. 100 ml odmerná banka

5.4. Kúpeľ s 20 °C vodou

5.5. Filter (Whatman č. 4 alebo rovnocenný)

5.6. Porcelánový (alebo platinový) téglik

5.7. Vodný kúpeľ

5.8. Horúca platňa

5.9. Muflová pec

5.10. 50 ml odmerná banka

5.11. 20 ml odmerná banka

5.12. Spektrofotometer nastavený na 420 nm

5.13. 1 cm kyveta

6. **Vzorky**

Pred analýzou sa vzorky skladujú pri izbovej teplote.

7. **Postup**

7.1. Príprava vzorky

7.1.1. Navážte 10 g vzorky do 100 ml kužeľovej banky (5.1.).

▼M1

7.1.2. Pridávajte postupne 70 ml etanolu (4.3.) po malých častiach s krúžením pri každom pridaní a vložte do ultrazvukového kúpeľa (5.2.) na 15 minút (alebo miešajte zmes magnetickým miešadlom (5.2.) 10 minút pri izbovej teplote).

7.1.3. Preneste obsah banky do 100 ml odmernej banky (5.3.) s premytím etanolom (4.3.). Upravte po kalibračnú značku etanolom (4.3.) a položte banku do 20 °C vodného kúpeľa (5.4.). Upravte po kalibračnú značku pri 20 °C.

7.1.4. Pridajte malé množstvo infuzóriovej hlinky (4.2.) a prefiltrujte (5.5.), odstráňte prvých 20 ml.

7.1.5. Preneste 25 ml filtrátu do porcelánového/platinového téglika (5.6.). Filtrát sa musí potom zahustiť jemným odparovaním na vodnom kúpeli s vriacou vodou (5.7.) pridaním 5 ml 15 % roztoku octanu horečnatého (4.4.).

7.1.6. Položte tégliky na horúci platňu (5.8) a zohrievajte kým nie sú suché.

7.1.7. Spopolnite zvyšok ohrievaním do bieleho žiaru pri 600 °C v muflovej peci (5.9.), pokiaľ nie je popol biely, minimálne jeden a pol hodiny, môže tam byť ale aj cez noc.

7.1.8. Pridajte do popola 10 ml 10 % kyseliny sírovej (4.5.) a preneste zmes prepláchnutím destilovanou vodou (4.1.) do 50 ml odmernej banky (5.10.) a pri izbovej teplote doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.). 5 ml podiel tohto roztoku popola sa má použiť na prípravu roztoku vzorky na fotometrické stanovenie.

7.2. Fotometrické stanovenie fosforečnanu

7.2.1. Porovnávací roztok

7.2.1.1. Dajte 10 ml 10 % kyseliny sírovej (4.5.) do 50 ml odmernej banky a doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.).

7.2.1.2. Pridajte do 5 ml podielu tohto roztoku (7.2.1.1.) v 20 ml odmernej banke (5.11.), 1 ml 1 N kyseliny sírovej (4.6.) a 2 ml fosforečného činidla (4.8.) a doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.).

7.2.1.3. Zazátkujte s voľne vloženou zátkou, potraste a zohrievajte na vodnom kúpeli s vriacou vodou (5.7.) 10 minút, potom nechajte chladiť vo vodnom kúpeli s 20 °C vodou (5.4.) 20 minút.

7.2.1.4. Naplňte 1 cm kyvetu (5.13.) týmto porovnávacím roztokom.

7.2.2. Roztok vzorky

7.2.2.1. Pridajte do 5 ml podielu roztoku popola (7.1.8.) v 20 ml odmernej banke (5.11.) 1 ml 1 N kyseliny sírovej (4.6.) a 2 ml fosforečného činidla (4.8.) a doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.).

7.2.2.2. Zazátkujte s voľne vloženou zátkou, potraste a zohrievajte na vodnom kúpeli s vriacou vodou (5.7.) 10 minút, potom nechajte chladiť na vodnom kúpeli 20 °C vodou (5.4.) 20 minút.

7.2.2.3. Žltý roztok, ktorý sa vytvoril, sa ihneď analyzuje spektrofotometricky (5.12.) v 1 cm kyvete (5.13.) pri 420 nm voči porovnávaciemu roztoku (7.2.1.4.).

7.2.3. Kalibračná krivka

7.2.3.1. S cieľom skonštruovania kalibračnej krivky dajte 2 ml podiely fosforečného činidla (4.8.) do 20 ml odmerných baniek (5.11.), každá z nich obsahuje 1 ml 1 N kyseliny sírovej (4.6.) a 0, 2, 4, 6, 8 a 10 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (4.7.) a doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.).

7.2.3.2. Zazátkujte voľne vloženou zátkou, potraste a zohrievajte na vodnom kúpeli s vriacou vodou (5.7.) 10 minút, potom nechajte chladiť na vodnom kúpeli 20 °C vodou (5.4.) 20 minút a analyzuje spektrofotometricky (5.12.) v 1 cm kyvete (5.13.) pri 420 nm voči porovnávaciemu roztoku (7.2.1.4.).

7.2.3.3. Zostrojenie kalibračnej krivky:

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

▼M1

8. **Vyjadrenie výsledkov**

Obsah vaječného žĺtka v g/l sa vypočíta z tejto rovnice:

$$\text{g/l vaječného žĺtka} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{hustota}}{E/40}$$

kde:

110	je prepočítavací faktor na celkový P_2O_5 v g v 100 g vaječného žĺtka,
mg P_2O_5	je hodnota stanovená z kalibračnej krivky,
hustota	je hmotnosť na jednotku objemu (g/ml) likéru na báze vajíčka pri 20 °C,
E	váha likéru na báze vajíčka v g,
40	faktor zriedenia pre 5 ml podiel roztoku popola.

9. **Charakteristika vybraných metrologických parametrov metódy (presnosť)**

Štatistické výsledky medzilaboratórnej skúšky:

nasledujúca tabuľka uvádza hodnoty pre vaječný žĺtok.

Nasledujúce údaje boli získané z medzinárodnej štúdie určenia vybraných parametrov metódy získané medzinárodne dohodnutým postupom.

Rok medzilaboratórnej skúšky:	1 998
Počet laboratórií:	24
Počet vzoriek:	5
Skúmaná látka:	vaječný žĺtok

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchýlených výsledkov	19	20	22	20	22
Počet odchýlených výsledkov (laboratóriá)	3	4	2	4	2
Počet prijatých výsledkov	38	40	44	40	4
Stredná hodnota	147,3	241,1	227,4	51,9*) 72,8*)	191,1
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Limit opakovateľnosti (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Typy vzoriek:

A Advocaat, slepé duplikáty,

B pastis, jediná vzorka,

C Advocaat, jediná vzorka,

D Advocaat (zriedený), delené hladiny*

E Advocaat, slepé duplikáty,