Το έγγραφο αυτό συνιστά βοήθημα τεκμηρίωσης και δεν δεσμεύει τα κοινοτικά όργανα

►**B** **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2870/2000 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

της 19ης Δεκεμβρίου 2000

για καθορισμό των κοινοτικών μεθόδων αναφοράς που εφαρμόζονται στις αναλύσεις στον τομέα των αλκοολούχων ποτών

(ΕΕ L 333 της 29.12.2000, σ. 20)

Τροποποιείται από:

		Επίσημη Εφημερίδα		
		αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
►**M1**	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2091/2002 της Επιτροπής της 26ης Νοεμβρίου 2002	L 322	11	27.11.2002

▼B

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2870/2000 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 19ης Δεκεμβρίου 2000

για καθορισμό των κοινοτικών μεθόδων αναφοράς που εφαρμόζονται στις αναλύσεις στον τομέα των αλκοολούχων ποτών

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89 του Συμβουλίου, της 29ης Μαΐου 1989, για τη θέσπιση των γενικών κανόνων σχετικά με τον ορισμό, το χαρακτηρισμό και την παρουσίαση των αλκοολούχων ποτών [1], όπως τροποποιήθηκε με την πράξη προσχώρησης της Αυστρίας, της Φινλανδίας και της Σουηδίας, και ιδίως το άρθρο 4 παράγραφος 8,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Το άρθρο 4 παράγραφος 8 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89 προβλέπει τη θέσπιση μεθόδων που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αλκοολούχων ποτών. Οι μέθοδοι αναφοράς πρέπει να χρησιμοποιούνται, για να εξασφαλίζεται η συμμόρφωση με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89 και τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1014/90 της Επιτροπής, της 24ης Απριλίου 1990, περί λεπτομερών κανόνων εφαρμογής για τον ορισμό, το χαρακτηρισμό και την παρουσίαση των αλκοολούχων ποτών [2], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2140/98 [3], όταν διενεργείται επίσημος έλεγχος ή σε περίπτωση διαφοράς.

(2) Είναι σκόπιμο, στο μέτρο του δυνατού, να υιοθετηθούν και να περιγραφούν ως κοινοτικές αναλυτικές μέθοδοι αναφοράς, οι μέθοδοι που τυγχάνουν γενικής αναγνώρισης.

(3) Προκειμένου να ληφθεί υπόψη η επιστημονική πρόοδος και οι διαφορές εξοπλισμού των επισήμων εργαστηρίων, σκόπιμο είναι να επιτραπεί, υπό την ευθύνη των υπευθύνων του εργαστηρίου, η εφαρμογή μεθόδων βασιζόμενων σε άλλες αρχές μέτρησης, εκτός των μεθόδων που περιγράφονται στο παράρτημα του παρόντος κανονισμού, όταν οι μέθοδοι αυτές προσφέρουν επαρκείς εγγυήσεις όσον αφορά το αποτέλεσμα και ανταποκρίνονται, ιδίως, στα κριτήρια που καθορίζονται στο παράρτημα της οδηγίας 85/591/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 20ής Δεκεμβρίου 1985, για την καθιέρωση κοινοτικών τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον έλεγχο των τροφίμων [4] και εφόσον μπορεί να αποδειχθεί ότι η διακύμανση στην ακρίβεια, στην επαναληψιμότητα και στην αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τις μεθόδους αυτές ευρίσκονται εντός των ορίων των αποτελεσμάτων που έχουν ληφθεί με τις μεθόδους αναφοράς, οι οποίες περιγράφονται στον παρόντα κανονισμό. Εφόσον τηρείται ο όρος αυτός, μπορεί να επιτραπεί η εφαρμογή άλλων μεθόδων ανάλυσης. Σημασία έχει ωστόσο, να διευκρινισθεί ότι σε περίπτωση διαφοράς, οι προαναφερθείσες άλλες μέθοδοι δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τις μεθόδους αναφοράς.

(4) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής εφαρμογής αλκοολούχων ποτών,

---

[1] ΕΕ L 160 της 12.6.1989, σ. 1.
[2] ΕΕ L 105 της 25.4.1990, σ. 9.
[3] ΕΕ L 270 της 7.10.1998, σ. 9.
[4] ΕΕ L 372 της 31.12.1985, σ. 50.

▼B

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Οι κοινοτικές μέθοδοι αναφοράς που εφαρμόζονται στις αναλύσεις στον τομέα των αλκοολούχων ποτών:

— σε περίπτωση διεξαγωγής επισήμου ελέγχου, ή

— σε περίπτωση διαφοράς,

για να διασφαλίσουν την τήρηση των διατάξεων που προβλέπονται στον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89 και στον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1014/90, σε περίπτωση διεξαγωγής επισήμων ελέγχων ή σε περίπτωση διαφοράς, είναι αυτές που περιλαμβάνονται στο παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Κατά παρέκκλιση προς το άρθρο 1 πρώτη περίπτωση, επιτρέπονται άλλες μέθοδοι ανάλυσης, υπό την ευθύνη των υπευθύνων του εργαστηρίου, υπό τον όρο ότι η ακρίβεια και η πιστότητα (επαναληπτικότητα και αναπαραγωγιμότητα) αυτών είναι τουλάχιστον ισοδύναμη με εκείνη των αντιστοίχων αναλυτικών μεθόδων αναφοράς που περιλαμβάνονται στο παράρτημα.

Άρθρο 3

Όταν δεν υπάρχουν κοινοτικές αναλυτικές μέθοδοι αναφοράς, για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των περιεχομένων ουσιών σε συγκεκριμένο αλκοολούχο ποτό, τότε εφαρμόζονται οι ακόλουθες μέθοδοι:

α) μέθοδοι ανάλυσης που έχουν καταστεί έγκυρες βάσει διεθνώς αναγνωρισμένων διαδικασιών, και ιδίως ανταποκρίνονται στα κριτήρια που έχουν τεθεί στο παράρτημα της οδηγίας 85/591/ΕΟΚ·

β) μέθοδοι ανάλυσης σύμφωνες προς τα συνιστώμενα πρότυπα του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO)·

γ) μέθοδοι ανάλυσης που έχουν αναγνωρισθεί από τη Γενική Συνέλευση του Διεθνούς Γραφείου Αμπέλου και Οίνου (OIV) και έχουν δημοσιευθεί με επιμέλειά του·

δ) εν απουσία μιας των μεθόδων όπως αναφέρονται στα στοιχεία α), β) και γ) και με τις προϋποθέσεις της ακρίβειας, της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητάς της:

— μία μέθοδος ανάλυσης, η οποία έχει εγκριθεί από το ενδιαφερόμενο κράτος μέλος,

— σε περίπτωση ανάγκης, οποιαδήποτε άλλη κατάλληλη μέθοδος ανάλυσης.

Άρθρο 4

Για την εφαρμογή του παρόντος κανονισμού:

α) «όριο επαναληψιμότητας» είναι η τιμή, μικρότερη η ίση της οποίας αναμένεται, σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 %, η απόλυτη τιμή της διαφοράς δύο μεμονωμένων αποτελεσμάτων τα οποία έχουν ληφθεί βάσει μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες (ίδιος τεχνικός εργαστηρίου, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ μεσολαβούν χρονικό διάστημα) (ISO 3534-1)·

β) «όριο αναπαραγωγιμότητας» είναι η τιμή, μικρότερη η ίση της οποίας αναμένεται, σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 %, η απόλυτη τιμή της διαφοράς δύο μεμονωμένων αποτελεσμάτων που λαμβάνονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικοί τεχνικοί εργαστηρίου, διαφορετικές συσκευές, ή/και διαφορετικά εργαστήρια,ή/και διαφορετικές χρονικές στιγμές) (ISO 3534-1)·

γ) «πιστότητα» είναι η εγγύτητα του αποτελέσματος της ανάλυσης σε σχέση με την τιμή αναφοράς (ISO 3534-1).

▼B

Άρθρο 5

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την έβδομη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Εφαρμόζεται από την 1η Ιανουαρίου 20001.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ:

I. Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου κατ' όγκον

Προσάρτημα I: Παρασκευή του αποστάγματος

Προσάρτημα II: Μέτρηση της μάζας κατ' όγκον του αποστάγματος

— Μέθοδος Α = μέτρηση με λήκυθο

— Μέθοδος Β = ηλεκτρονικό πυκνόμετρο

— Μέθοδος Γ = πυκνομετρική μέτρηση με τη βοήθεια υδροστατικού ζυγού

II. Προσδιορισμός ολικού ξηρού εκχυλίσματος με σταθμική μέθοδο

III. Προσδιορισμός πτητικών και μεθανόλης

III.1. Γενικές παρατηρήσεις

III.2. Πτητικά συστατικά: αλδεΰδες, ανώτερες αλκοόλες, οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη (αέρια χρωματογραφία)

III.3. Πτητική οξύτητα (p.m.)

IV. Υδροκυανικό οξύ (p.m.)

V. Ανηθόλη ►M1 ——— ◄

VI. Γλυκυρριζικό οξύ ►M1 ——— ◄

VII. Χαλκόνες ►M1 ——— ◄

VIII. Ολικά ζάχαρα (p.m.)

IX. Κρόκος αυγού ►M1 ——— ◄

▼B

I. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΚΑΤ' ΟΓΚΟ ΤΩΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ

Εισαγωγή

Η μέθοδος αναφοράς περιλαμβάνει δύο προσαρτήματα:

Προσάρτημα I: Παρασκευή αποστάγματος

Προσάρτημα II: Μέτρηση της πυκνότητας αποστάγματος

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του αληθούς αλκοολικού τίτλου κατ' όγκο των αλκοολούχων ποτών.

2. **Παραπομπή σε προδιαγραφές**

ISO 3696:1987 Νερό αναλυτικής καθαρότητας — Προδιαγραφές και μέθοδοι δοκιμής

3. **Όροι και ορισμοί**

3.1. *Θερμοκρασία αναφοράς:*

Η θερμοκρασία αναφοράς για τον προσδιορισμό του αλκοολικού τίτλου κατ' όγκον, της πυκνότητας και του ειδικού βάρους των αλκοολούχων ποτών είναι εκείνη των 20 ºC.

Σημείωση 1: Ο όρος «σε t ºC» επιφυλάσσεται για όλους τους προσδιορισμούς (της πυκνότητας ή του αλκοολικού τίτλου κατ' όγκον) που γίνονται σε θερμοκρασίες άλλες, πλην της θερμοκρασίας αναφοράς των 20 ºC.

3.2. *Πυκνότητα:*

Πυκνότητα είναι η μάζα ανά μονάδα όγκου των αλκοολούχων ποτών, στο κενό και στη θερμοκρασία των 20 ºC. Εκφράζεται σε χιλιόγραμμα ανά κυβικό μέτρο και συμβολίζεται με το $\rho_{20\ ^\circ C}$ ή ρ_{20}.

3.3. *Σχετική πυκνότητα:*

Σχετική πυκνότητα στους 20 ºC είναι ο λόγος, εκφραζόμενος με δεκαδικό αριθμό, της πυκνότητας του αλκοολούχου ποτού στους 20 ºC προς την πυκνότητα του νερού στην ίδια θερμοκρασία. Παριστάνεται με το σύμβολο $d_{20\ ^\circ C/20\ ^\circ C}$ ή $d_{20/20}$, ή απλώς d όταν δεν υπάρχει πιθανότητα σύγχυσης. Το (χαρακτηριστικό) μέγεθος που εκάστοτε μετράται πρέπει να αναγράφεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης με τη χρησιμοποίηση των προαναφερομένων και μόνο συμβόλων.

Σημείωση 2: Είναι δυνατή η εύρεση της σχετικής πυκνότητας από την πυκνότητα ρ_{20} στους 20 ºC:

$\rho_{20} = 998{,}203 \times d_{20/20}$ ή $d_{20/20} = \rho_{20}/998{,}203$, όπου 998,203 η πυκνότητα του νερού σε 20 ºC.

3.4. *Αληθής αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο:*

Ο αληθής αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο των αλκοολούχων ποτών είναι ίσος προς τον αριθμό λίτρων αιθυλικής αλκοόλης που περιέχονται σε 100 l μείγματος νερού-αλκοόλης που έχει την ίδια πυκνότητα με αυτήν του αλκοολικού αποστάγματος που προκύπτει μετά από απόσταξη του αλκοολούχου ποτού. Οι τιμές αναφοράς για τον αλκοολικό τίτλο κατ' όγκο (% vol) στους 20 ºC συναρτήσει της πυκνότητας στους 20 ºC, για διάφορα μείγματα νερού-αλκοόλης, που πρέπει να χρησιμοποιούνται, είναι αυτές που περιλαμβάνονται στον διεθνή πίνακα που έχει αναγνωρισθεί από την International Legal Metrology Organisation στη σύστασή της με αριθ. 22.

Η γενική εξίσωση που συνδέει τον αλκοολικό τίτλο κατ' όγκο και την πυκνότητα μειγμάτων νερού-αλκοόλης, σε δεδομένη θερμοκρασία, περιλαμβάνεται στο κεφάλαιο 3 «Αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο» του παραρτήματος του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2676/90 (ΕΕ L 272 της 3.10.1990, σ.1) ή στο εγχειρίδιο αναλυτικών μεθόδων του OIV (1994) (σ. 17).

Σημείωση 3: Προκειμένου για τα λικέρ και τις κρέμες για τα οποία είναι δύσκολο να μετρηθεί ο όγκος με

▼B

ακρίβεια, το δείγμα πρέπει να ζυγίζεται και προσδιορίζεται, κατ' αρχήν, ο αλκοολικός τίτλος κατά βάρος.

Τύπος μετατροπής:

$$\text{Αλκοολικός τίτλος κατ' όγκον (\% vol)} = \frac{\text{ΑΤΜ (\% μάζα)} \times \rho_{20}\ \text{(δείγμα)}}{\rho_{20}\ \text{(αλκοόλη)}}$$

όπου ΑΤΜ = αλκοολικός τίτλος κατά βάρος.

ρ_{20} (αλκοόλη) = 789,24 kg/m^3

4. **Αρχή**

Ο αλκοολικός τίτλος κατ' όγκον του αποστάγματος προσδιορίζεται, μετά από απόσταξη, με λήκυθο, ηλεκτρονικό πυκνόμετρο η με υδροστατικό ζυγό.

▼B

ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ I: ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΟΣ

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Σύμφωνα με τη μέθοδο, παρασκευάζονται αποστάγματα, που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για τον προσδιορισμό του αληθούς αλκοολικού τίτλου κατ' όγκο των αλκοολούχων ποτών.

2. **Αρχή**

Τα αλκοολούχα ποτά αποστάζονται, προκειμένου να διαχωρισθεί η αιθυλική αλκοόλη και οι άλλες πτητικές ουσίες από το εκχύλισμα (ουσίες μη αποστάζουσες).

3. **Αντιδραστήρια και υλικά**

3.1. Κόκκοι ομαλού βρασμού.

3.2. Πυκνό αντιαφριστικό γαλάκτωμα (για λικέρ κρέμας).

4. **Συσκευές και εξοπλισμός**

Συνήθεις συσκευές εργαστηρίου και ειδικότερα τα εξής:

4.1. Υδρόλουτρο ικανό να διατηρείται σε θερμοκρασία από 10 ºC έως 15 ºC.

Υδρόλουτρο ικανό να διατηρείται σε θερμοκρασία 20 ºC (± 0,2 ºC).

4.2. Ογκομετρικές φιάλες 100 ml και 200 ml κλάσης Α, διακριβωμένες με ακρίβεια ± 0,1 % και 0,15 % αντίστοιχα.

4.3. Συσκευή απόσταξης:

4.3.1. Γενικές απαιτήσεις

Η χρησιμοποιούμενη αποστακτική συσκευή πρέπει να τηρεί τις εξής απαιτήσεις:

— ο αριθμός των συνδεσμολογιών πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός και να εξασφαλίζεται η στεγανότητα του συστήματος,

— ύπαρξη μηχανισμού για την αποτροπή κοχλασμού (το ζέον υγρό συμπαρασύρεται από τον ατμό) και για την ομαλή ρύθμιση της ταχύτητας απόσταξης των πλούσιων σε αλκοόλη ατμών,

— ταχεία και ολοκληρωτική συμπύκνωση των ατμών της αλκοόλης,

— συλλογή των πρώτων κλασμάτων της απόσταξης σε υδατικό μέσο.

Η χρησιμοποιούμενη πηγή θερμότητας πρέπει να περιλαμβάνει και κατάλληλη διάταξη για τη διάχυση της θερμότητας, ώστε να αποφεύγονται οι πυρολύσεις του εκχυλίσματος.

4.3.2. Μία κατάλληλη συσκευή απόσταξης παρουσιάζεται στην εικόνα 1 και περιλαμβάνει τα εξής μέρη:

— σφαιρική φιάλη του ενός λίτρου, με τυποποιημένο σύνδεσμο από εσμυρισμένο γυαλί,

— στήλη απόσταξης, ύψους τουλάχιστον 20 cm (για παράδειγμα στήλη Vigreux),

— κεκαμμένος σύνδεσμος με ευθύγραμμο συμπυκνωτή μήκους 10 cm περίπου (τύπου West), κάθετης προσαρμογής,

— ψυκτήρας μήκους 40 cm,

— σωλήνας απαγωγής, μέσω του οποίου απάγεται το απόσταγμα προς τον πυθμένα βαθμονομημένης φιάλης, η οποία περιέχει μικρή ποσότητα νερού.

Σημείωση: Η συσκευή που περιγράφεται παραπάνω έχει προβλεφθεί για δείγμα τουλάχιστον 200 ml. Ωστόσο, η συσκευή μπορεί να δέχεται μικρότερα δείγματα, με τη χρησιμοποίηση μικρότερης σφαιρικής φιάλης, αρκεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλο επίθεμα ή άλλος μηχανισμός, ώστε να αποφεύγεται η διαφυγή υγρού.

▼B

5. **Φύλαξη των δειγμάτων**

Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν υποστούν ανάλυση.

6. **Διαδικασία**

Προκαταρκτική παρατήρηση:

Η απόσταξη μπορεί επίσης να γίνει με την διαδικασία που δημοσιεύτηκε από τη IUPAC (1968).

6.1. Έλεγχος της συσκευής απόσταξης

Η χρησιμοποιούμενη συσκευή πρέπει (να είναι σε θέση να):

Κατά την δι' αυτής απόσταξη 200 ml διαλύματος νερού-αλκοόλης, γνωστής συγκέντρωσης, κοντά στο 50 % κατ' όγκο, να μην παρατηρούνται απώλειες αλκοόλης ανώτερες του 0,1 % κατ' όγκον.

6.2. Αλκοολούχα ποτά αλκοολικού τίτλου κάτω του 50 % κατ' όγκον.

200 ml του αλκοολούχου ποτού φέρονται σε ογκομετρική φιάλη.

Σημειώνεται η θερμοκρασία του υγρού ή διατηρείται σταθερή στη θερμοκρασία αναφοράς (20 ºC).

Το δείγμα εισάγεται στη σφαιρική φιάλη της αποστακτικής συσκευής και η ογκομετρική φιάλη εκπλένεται τρις, με ποσότητα 20 ml περίπου αποσταγμένου νερού, κάθε φορά. Τα υγρά της έκπλυσης προστίθενται κάθε φορά στο περιεχόμενο της φιάλης απόσταξης.

Σημείωση: Η αραίωση αυτή στα 60 ml είναι επαρκής για αλκοολούχα που περιέχουν λιγότερο από 250 g ξηρού εκχυλίσματος ανά λίτρο. Άλλως, για να αποφευχθεί η πυρόλυση, ο όγκος των υγρών της έκπλυσης πρέπει να είναι τουλάχιστον 70 ml, αν η συγκέντρωση του ξηρού αποστάγματος είναι 300 g/l, 85 ml για 400 g/l ξηρού εκχυλίσματος και 100 ml για 500 g/l ξηρού εκχυλίσματος (π.χ. σε ορισμένα λικέρ φρούτων ή κρέμες). Οι όγκοι αυτοί προσαρμόζονται αναλόγως, στην περίπτωση διαφορετικού όγκου του δείγματος.

Προστίθενται μερικοί κόκκοι, για την αποφυγή βιαίου βρασμού (3.1) (και αντιαφριστικό για λικέρ κρέμας).

Εισάγονται 20 ml αποσταγμένο νερό στην αρχική ογκομετρική φιάλη των 200 ml που θα χρησιμοποιηθεί και για τη συλλογή του αποστάγματος. Η φιάλη αυτή πρέπει, κατόπιν, να τοποθετηθεί σε κρύο υδρόλουτρο (4.1) (10 ºC έως 15 ºC για αλκοολούχα με γλυκάνισο).

Το όλο περιεχόμενο της φιάλης αποστάζεται προσεκτικά, κατά περίπτωση δε και υπο ανάδευση, ώστε να αποφεύγονται οι απώλειες και η απανθράκωση, μέχρις ότου το επίπεδο του αποστάγματος βρεθεί μερικά χιλιοστά κάτω από τη χαραγή βαθμονόμησης της ογκομετρικής φιάλης συλλογής του.

Όταν η θερμοκρασία του αποστάγματος φθάσει σε ± 0,5 ºC σε σχέση με την αρχική θερμοκρασία του υγρού, τούτο συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή βαθμονόμησης με αποσταγμένο νερό και το όλον αναμιγνύεται καλά.

Το απόσταγμα αυτό χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αλκοολικού τίτλου κατ' όγκο (παράρτημα II).

6.3. Αλκοολούχα ποτά αλκοολικού τίτλου άνω του 50 % κατ' όγκον.

Παραλαμβάνονται 100 ml από το αλκοολούχο ποτό σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, και στη συνέχεια μεταφέρονται στη σφαιρική φιάλη της αποστακτικής συσκευής.

Η ογκομετρική φιάλη ξεπλένεται, μερικές φορές, με αποσταγμένο νερό και τα υγρά της έκπλυσης προστίθενται στο περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης απόσταξης. Χρησιμοποιείται αρκετό νερό, ώστε το περιεχόμενο της φιάλης να φθάσει στα 230 ml περίπου.

▼B

Σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml φέρονται 20 ml αποσταγμένου νερού. Σ' αυτήν θα συλλεγεί το απόσταγμα. Η φιάλη τοποθετείται κατόπιν σε υδρόλουτρο κρύου νερού (4.1) (10 έως 15 ºC για αλκοολούχα ποτά με γλυκάνισο).

Το περιεχόμενο αποστάζεται, υπο συχνή ανάδευση, μέχρις ότου η στάθμη του αποστάγματος βρεθεί μερικά χιλιοστά κάτω από τη χαραγή βαθμονόμησης της ογκομετρικής φιάλης των 200 ml.

Όταν η θερμοκρασία του αποστάγματος φθάσει σε ± 0,5 ºC σε σχέση με την αρχική θερμοκρασία του υγρού, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό και το όλον αναμειγνύεται καλά.

Το απόσταγμα αυτό χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αλκοολικού τίτλου κατ' όγκον (παράρτημα II).

Σημείωση: Ο αλκοολικός τίτλος κατ' όγκον του αλκοολούχου ποτού είναι ο αλκοολικός τίτλος του αποστάγματος επί δύο.

▼B

ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ II: ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΣ Α: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΛΗΘΟΥΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΚΑΤ' ΟΓΚΟΝ ΤΩΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ — ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕ ΛΗΚΥΘΟ

A.1. **Αρχή**

Ο αλκοολικός τίτλος κατ' όγκον ευρίσκεται από την πυκνότητα του αποστάγματος, η οποία προσδιορίζεται με τη λήκυθο.

A.2. **Αντιδραστήρια και υλικά**

Κατά την ανάλυση, εκτός αν άλλως ορίζεται, χρησιμοποιούνται μόνο αντιδραστήρια αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας και νερό βαθμού τουλάχιστον 3, όπως καθορίζεται στην προδιαγραφή ISO 3696:1987.

A.2.1. Διάλυμα χλωριούχου νατρίου (2 % w/v)

Για την παρασκευή ενός λίτρου του διαλύματος, ζυγίζονται 20 g χλωριούχου νατρίου και διαλύονται σε νερό μέχρις όγκου 1 λίτρου.

A.3. **Συσκευές και εξοπλισμός**

Συνήθης εξοπλισμός εργαστηρίου, και ειδικότερα τα εξής:

A.3.1. Ζυγός αναλυτικός με δυνατότητα ζύγισης 0,1 mg.

A.3.2. Θερμόμετρο, με σύνδεσμο από εσμυρισμένο γυαλί, βαθμονομημένο σε δέκατα του βαθμού, από 10 έως 30 ºC. Το θερμόμετρο αυτό πρέπει να είναι διακριβωμένο ή να έχει ελεγχθεί με διακριβωμένο άλλο.

A.3.3. Γυάλινη λήκυθος, πυρέξ, χωρητικότητας 100 ml περίπου, εξοπλισμένη με κινητό θερμόμετρο από εσμυρισμένο γυαλί (A.3.2). Η λήκυθος φέρει πλευρικό σωλήνα μήκους 25 mm και εσωτερικής διαμέτρου 1 mm (το ανώτερο), που καταλήγει σε κωνικό εσμυρισμένο σύνδεσμο. Άλλες λήκυθοι, όπως περιγράφονται στην ISO 3507, π.χ. 50 ml, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αν χρειάζεται.

A.3.4. Φιάλη-αντίβαρο, του αυτού εξωτερικού όγκου (με ακρίβεια 1 ml) με τη λήκυθο και μάζας ίσης προς τη μάζα αυτής γεμάτης με υγρό πυκνότητας 1.01 (διάλυμα χλωριούχου νατρίου, A.2.1).

A.3.5. Θερμομονωτικό περίβλημα που προσαρμόζεται ακριβώς στο σώμα της ληκύθου.

Σημείωση 1: Κατά τη μέθοδο προσδιορισμού των πυκνοτήτων εν κενώ των αλκοολούχων ποτών γίνεται χρήση ζυγού δύο δίσκων, ληκύθου και (μιας) φιάλης-αντίβαρου του ίδιου εξωτερικού όγκου, ώστε να εξουδετερώνεται η επίδραση της άνωσης του αέρα στο σύστημα ανά πάσα στιγμή. Αυτή η απλή τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί και με τη χρησιμοποίηση ζυγού ενός δίσκου, αρκεί η φιάλη-αντίβαρο να ζυγίζεται και πάλι, ώστε να ελέγχονται οι μεταβολές της άνωσης κατά τη διάρκεια του πειράματος.

A.4. **Διαδικασία**

Προκαταρκτικές παρατηρήσεις:

Στην ακόλουθη μέθοδο χρησιμοποιείται, για τον προσδιορισμό του αλκοολικού τίτλου, λήκυθος των 100-ml· με αυτήν επιτυγχάνεται η καλύτερη ακρίβεια. Ωστόσο, μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί και μικρότερη λήκυθος, π.χ. των 50 ml.

A.4.1. Βαθμονόμηση ληκύθου

Η λήκυθος βαθμονομείται με τον προσδιορισμό των εξής παραμέτρων:

— βάρος κενής ληκύθου,

— όγκος ληκύθου στους 20 ºC,

— μάζα ληκύθου γεμάτης με νερό στους 20 ºC.

▼B

Α.4.1.1. Βαθμονόμηση με τη χρήση ζυγού ενός δίσκου:

Προσδιορίζεται:

— η μάζα της καθαρής, στεγνής ληκύθου (P),

— η μάζα της ληκύθου γεμάτης με νερό σε t ºC (P1)

— η μάζα της φιάλης-αντίβαρου (T0).

Α.4.1.1.1. Ζυγίζεται η καθαρή, στεγνή λήκυθος (P).

Α.4.1.1.2. Η λήκυθος πληρούται προσεκτικά με αποσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου και προσαρμόζεται το θερμόμετρο.

Η λήκυθος στεγνώνεται προσεκτικά και τοποθετείται στο θερμομονωτικό περίβλημα. Το περιεχόμενο αναδεύεται δι' ανακινήσεως της ληκύθου, μέχρις ότου σταθεροποιηθεί η ένδειξη της θερμοκρασίας, στο θερμόμετρο.

Η λήκυθος φέρεται στο ίδιο επίπεδο με το ανώτερο χείλος του πλευρικού σωλήνα. Διαβάζεται προσεκτικά η θερμοκρασία t ºC και διορθώνεται ενδεχομένως κατά το σφάλμα ακριβείας της κλίμακας του θερμομέτρου.

Ζυγίζεται η γεμάτη με νερό λήκυθος (P1).

Α.4.1.1.3. Ζυγίζεται η φιάλη-αντίβαρο (T0).

Α.4.1.1.4. Υπολογισμός:

— βάρος της κενής ληκύθου = P + m

όπου m είναι η μάζα του αέρα που περιέχεται στη λήκυθο

$m = 0{,}0012 \times (P1 - P)$

Σημείωση 2: 0,0012 είναι η πυκνότητα του ξηρού αέρα σε 20 ºC και σε πίεση 760 mm Hg.

— Όγκος της ληκύθου στους 20 ºC:

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

όπου F_t είναι ο συντελεστής για τη θερμοκρασία t ºC, ο οποίος λαμβάνεται από τον πίνακα I του κεφαλαίου 1 «Πυκνότητα και ειδικό βάρος» του παραρτήματος του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2676/90 (σ. 10).

Ο όγκος στους 20 ºC πρέπει να είναι γνωστός με προσέγγιση 0,001 ml.

— μάζα του νερού στο πυκνόμετρο στους 20 ºC:

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ όπου 0,998203 είναι η πυκνότητα του νερού στους 20 ºC.

Σημείωση 3: Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τιμή 0,99715 της πυκνότητας στον αέρα και να υπολογιστεί ο αλκοολικός τίτλος συναρτήσει της αντίστοιχης πυκνότητας στον αέρα, από τους τελωνειακούς και δασμολογικούς πίνακες του Ηνωμένο Βασιλείου. Στην περίπτωση αυτή, δεν χρειάζεται διόρθωση για τη μάζα του περιεχομένου στη λήκυθο αέρα.

Α.4.1.2. Μέθοδος βαθμονόμησης με ζυγό δύο δίσκων:

Α.4.1.2.1. Η φιάλη-αντίβαρο τοποθετείται στον αριστερό δίσκο του ζυγού και η καθαρή και στεγνή λήκυθος με το πώμα-δέκτη στο δεξιό δίσκο. Επιτυγχάνεται ισορροπία των δύο δίσκων τοποθετώντας, δίπλα στη λήκυθο, σταθμά ακριβείας: έστω p γραμμάρια (p).

Α.4.1.2.2. Η λήκυθος πληρούται, προσεκτικά, με αποσταγμένο νερό, σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετείται το θερμόμετρο· στη συνέχεια η λήκυθος σκουπίζεται προσεκτικά, για να στεγνώσει, και τοποθετείται στο θερμομονωτικό περίβλημα. Το περιεχόμενο αναδεύεται, δι' ανακινήσεως της ληκύθου, μέχρις ότου σταθεροποιηθεί η ένδειξη της θερμοκρασίας, στο θερμόμετρο.

▼B

Η λήκυθος φέρεται στο ίδιο επίπεδο με το ανώτερο χείλος του πλευρικού σωλήνα. Ο πλευρικός αυτός σωλήνας σπογγίζεται και τοποθετείται το πώμα-δέκτης. Διαβάζεται προσεκτικά η θερμοκρασία t ºC και διορθώνεται ενδεχομένως κατά το σφάλμα ακριβείας της κλίμακας του θερμομέτρου.

Η λήκυθος ζυγίζεται γεμάτη με νερό και έστω p′ το βάρος σε γραμμάρια για το οποίο επιτυγχάνεται η ισορροπία των δίσκων.

Α.4.1.2.3. Υπολογισμοί:

— βάρος της κενής ληκύθου = p + m

όπου m είναι η μάζα του αέρα που περιέχεται στη λήκυθο.

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

— Όγκος ληκύθου στους 20 ºC:

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

όπου F_t είναι ο συντελεστής για τη θερμοκρασία t ºC, λαμβανόμενος από τον πίνακα I του κεφαλαίου 1 «Πυκνότητα και ειδικό βάρος» του παραρτήματος του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2676/90 (σ. 10).

Ο όγκος στους 20 ºC πρέπει να είναι γνωστός με προσέγγιση 0,001 ml.

— Μάζα του νερού στη λήκυθο στους 20 ºC:

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

όπου 0,998203 είναι η πυκνότητα του νερού στους 20 ºC.

Α.4.2. Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου του δείγματος

Α.4.2.1. Χρησιμοποίηση ζυγού ενός δίσκου.

Α.4.2.1.1. Ζυγίζεται η φιάλη-αντίβαρο, έστω βάρος T1.

Α.4.2.1.2. Η λήκυθος γεμάτη με το παρασκευασθέν απόσταγμα ζυγίζεται (βλέπε παράρτημα I), έστω δε P2 το βάρος της στους t ºC.

Α.4.2.1.3. Υπολογισμοί

— dT = T1 - T0

— Μάζα της κενής ληκύθου κατά τη στιγμή της μέτρησης =

P − m + dT

— Μάζα του υγρού στη λήκυθο στους t ºC =

P2 − (P − m + dT)

— Πυκνότητα στους t ºC, σε g/ml

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

— Η πυκνότητα στους t ºC εκφράζεται σε χιλιόγραμμα ανά m^3, πολλαπλασιάζοντας το $\rho_{t\,°C}$ επί 1 000, η δε ούτω λαμβανόμενη τιμή ορίζεται ως ρ_t.

— Από την πυκνότητα ρ_t προσδιορίζεται δι' αναγωγής η πυκνότητα ρ_{20} με χρησιμοποίηση του πίνακα πυκνοτήτων ρ-Τ για μείγματα νερού-αλκοόλης [πίνακας II του παραρτήματος II του εγχειριδίου αναλυτικών μεθόδων του OIV (1994), σ. 17-29].

Στον εν λόγω πίνακα αναζητείται στην οριζόντια γραμμή που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία Τ, εκφραζόμενη σε ακέραιο αριθμό, που είναι αμέσως μικρότερη από την t ºC, η μικρότερη τιμή πυκνότητας που είναι μεγαλύτερη από την ρ_t. Για τον υπολογισμό της πυκνότητας ρ του αλκοολούχου ποτού στη θερμοκρασία Τ, χρησιμοποιείται η διαφορά που αναγράφεται στον πίνακα κάτω από την πυκνότητα αυτή.

— Στη γραμμή της θερμοκρασίας Τ, αναζητείται η πυκνότητα ρ′ που είναι αμέσως μεγαλύτερη από την ρ και υπολογίζεται η διαφορά μεταξύ τους. Η διαφορά αυτή διαιρείται με τον αριθμό που αναγράφεται δεξιά της πυκνότητας ρ′ στον πίνακα. Το πηλίκο δίνει το δεκαδικό μέρος του αλκοολικού τίτλου, ενώ το ακέραιο μέρος του αλκοολικού τίτλου αναγράφεται στην κορυφή της στήλης στην οποία ευρίσκεται η πυκνότητα ρ′ (Dt, ο αλκοολικός τίτλος).

▼B

Σημείωση 4: Εναλλακτικά, η λήκυθος, κατά τη συμπλήρωσή της μέχρι τη χαραγή, τηρείται σε υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 20 ºC ± 0,2 ºC.

Α.4.2.1.4. Αποτελέσματα

Ο αληθής αλκοολικός τίτλος υπολογίζεται από την πυκνότητα ρ_{20}, με χρήση των πινάκων του αλκοολικού τίτλου που περιλαμβάνονται παρακάτω:

Ο πίνακας που παρέχει την τιμή του αλκοολικού τίτλου κατ' όγκον (% vol) στους 20 ºC συναρτήσει της πυκνότητας στους 20 ºC μειγμάτων νερού-αλκοόλης, είναι ο διεθνής πίνακας που θεσπίστηκε από την International Legal Metrology Organisation στη σύστασή της με αριθ. 22.

Α.4.2.2. Χρησιμοποίηση ζυγού ενός δίσκου.

Α.4.2.2.1. Ζυγίζεται η λήκυθος γεμάτη με το παρασκευασθέν απόσταγμα (βλέπε μέρος I), έστω p″ η μάζα στους t ºC.

Α.4.2.2.2. Υπολογισμός

— Μάζα του περιεχομένου στη λήκυθο υγρού σε t ºC
= p + m − p

— Πυκνότητα t ºC σε g/ml
$P_{t\,°C} = (p + m - p'')/V_{20\,°C}$

— Η πυκνότητα στους t ºC εκφράζεται σε χιλιόγραμμα ανά m^3 και διορθώνεται ως προς τη θερμοκρασία, προκειμένου να υπολογισθεί ο αλκοολικός τίτλος στους 20 ºC, όπως αναφέρεται παραπάνω για τη χρησιμοποίηση ζυγού ενός δίσκου.

Α.5. **Χαρακτηριστικά επιδόσεων της μεθόδου (πιστότητα)**

Α.5.1. Στατιστικά αποτελέσματα διεργαστηριακών δοκιμών.

Τα παρακάτω στοιχεία ελήφθησαν από μια διεθνή μελέτη των επιδόσεων της μεθόδου με βάση διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες [1] [2].

Έτος των διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	20
Αριθμός δειγμάτων	6

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E	Z
Αριθμός προεκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	19	20	17	19	19	17
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	1	—	2	1	1	3
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	38	40	34	38	38	34
Μέση τιμή ($\bar{x}$) % vol	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Τυπική απόκληση επαναληψιμότητας (s_r) % vol	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Σχετική τυπική απόκληση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Όριο επαναληψιμότητας (r) % vol	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Τυπική απόκληση αναπαραγωγιμότητας (s_R) % vol	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Όριο αναπαραγωγικότητας (R) % vol	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

▼B

Τύποι δειγμάτων:
Α Λικέρ φρούτου· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
Β Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Γ Ουίσκυ· διπλά τυφλά.
Δ Γκράπα· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
Ε Ακουαβίτ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
Ζ Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

ΜΕΘΟΔΟΣ Β: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΛΗΘΟΥΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΚΑΤ' ΟΓΚΟ ΤΩΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ — ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΟ (ΒΑΣΙΣΜΕΝΟ ΣΤΟ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΤΑΛΑΝΤΩΣΗΣ ΕΝΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΥΨΕΛΙΔΑ ΤΑΛΑΝΤΩΣΗΣ

Β.1. Αρχή

Η πυκνότητα του υγρού προσδιορίζεται με μέτρηση ηλεκτρονικά των ταλαντώσεων ενός ταλαντούμενου υοειδούς σωλήνα. Κατά τη μέτρηση αυτή, το δείγμα εισάγεται στο ταλαντούμενο σύστημα, του οποίου έτσι η ιδιαίτερη συχνότητα (ιδιοσυχνότητα) ταλάντωσης μεταβάλλεται από την προστεθείσα μάζα.

Β.2. Αντιδραστήρια και υλικά

Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, εκτός εάν άλλως ορίζεται, χρησιμοποιούνται μόνο αντιδραστήρια αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας και νερό βαθμού τουλάχιστον 3, όπως καθορίζεται στην προδιαγραφή ISO 3696:1987.

Β.2.1. Ακετόνη (CAS 666-52-4) ή απόλυτη αλκοόλη.

Β.2.2. Ξηρός αέρας.

Β.3. Συσκευές και εξοπλισμός

Συνήθεις εργαστηριακές συσκευές και ειδικότερα τα εξής:

Β.3.1. Ψηφιακό πυκνόμετρο

Για την εκτέλεση τέτοιων μετρήσεων, το ηλεκτρονικό πυκνόμετρο θα πρέπει να μπορεί να παρέχει την πυκνότητα σε g/ml, με ακρίβεια μέχρι 5ου δεκαδικού ψηφίου.

Σημείωση 1: Το πυκνόμετρο τοποθετείται σε απόλυτα σταθερή βάση, ώστε να είναι μονωμένο από κάθε είδους κραδασμούς.

Β.3.2. Ρύθμιση θερμοκρασίας

Η λειτουργία του πυκνομέτρου θεωρείται αποδεκτή μόνο εάν η κυψελίδα μέτρησης συνδέεται σε ειδικό ρυθμιστή θερμοκρασίας που μπορεί να επιτύχει σταθερότητα θερμοκρασίας μέσα στο όριο των ± 0,02 ºC ή καλύτερη.

Σημείωση 2: Η ακριβής ρύθμιση και παρακολούθηση της θερμοκρασίας στην κυψελίδα μέτρησης είναι απαραίτητη, καθ' όσον σφάλμα κατά 0,1 ºC μπορεί να οδηγήσει σε διαφορά στην πυκνότητα της τάξης του 0,1 kg/m^3.

Β.3.3. Σύριγγες έγχυσης του δείγματος ή αυτόματη συσκευή/αυτόματος δειγματολήπτης.

Β.4. Διαδικασία

Β.4.1. Βαθμονόμηση του πυκνομέτρου

Η συσκευή πρέπει να βαθμονομείται, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όταν τίθεται για πρώτη φορά σε λειτουργία. Πρέπει να επαναβαθμονομείται τακτικά και να ελέγχεται με βάση κάποιο επίσημο πρότυπο αναφοράς ή κάποιο διάλυμα εσωτερικού προτύπου του εργαστηρίου ρυθμισμένου με επίσημο πρότυπο αναφοράς.

Β.4.2. Προσδιορισμός της πυκνότητας του δείγματος

Β.4.2.1. Αν απαιτείται, η κυψελίδα καθαρίζεται και στεγνώνεται με ακετόνη ή απόλυτη αλκοόλη και ξηρό αέρα και εκπλένεται με το δείγμα.

▼B

Β.4.2.2. Το δείγμα εισάγεται στην κυψελίδα (με χρησιμοποίηση σύριγγας ή της αυτόματης συσκευής) η οποία και πληρούται. Κατά τη διάρκεια της πλήρωσης βεβαιωθείτε ότι δεν έχουν εγκλωβιστεί στο υγρό φυσαλίδες αέρα. Το δείγμα πρέπει να είναι ομοιογενές και απαλλαγμένο τελείως αιωρημάτων. Κάθε υλικό εν αιωρήσει πρέπει να απομακρύνεται με διήθηση πριν από την ανάλυση.

Β.4.2.3. Η πυκνότητα ρ_{20} ή ο αλκοολικός τίτλος που παρέχεται από το πυκνόμετρο καταγράφεται, μόλις σταθεροποιηθεί η σχετική ένδειξη.

Β.4.3. Αποτελέσματα

Εφόσον χρησιμοποιείται η πυκνότητα ρ_{20} ο αληθής αλκοολικός τίτλος υπολογίζεται με χρήση των πινάκων του αλκοολικού τίτλου που παρουσιάζονται παρακάτω:

Ο πίνακας που παρέχει την τιμή του αλκοολικού τίτλου (% vol) στους 20 ºC συναρτήσει της πυκνότητας στους 20 ºC μειγμάτων νερού-αλκοόλης είναι ο διεθνής πίνακας που θεσπίστηκε από την International Legal Metrology Organisation, στη σύσταση με αριθ. 22.

Β.5. **Χαρακτηριστικά επιδόσεων της μεθόδου (πιστότητα)**

Β.5.1. Στατιστικά αποτελέσματα διεργαστηριακών δοκιμών

Τα παρακάτω στοιχεία ελήφθησαν από μια διεθνή μελέτη επιδόσεων της μεθόδου με βάση διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες [1] [2].

Έτος των διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	16
Αριθμός δειγμάτων	6

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E	Z
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	11	13	15	16	14	13
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	2	3	1	—	1	2
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	22	26	30	32	28	26
Μέση τιμή ($\bar{x}$) % vol	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (s_r) % vol	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας(RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Όριο επαναληψιμότητας (r) % vol	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (s_R) % vol	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) % vol	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Τύποι δειγμάτων:
A Λικέρ φρούτου· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
B Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Γ Ουίσκυ· διπλά τυφλά.
Δ Γκράπα· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
E Ακουαβίτ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
Z Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

▼B

ΜΕΘΟΔΟΣ Γ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΛΗΘΟΥΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΚΑΤ' ΟΓΚΟΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ — ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΟΥ ΖΥΓΟΥ

Γ.1. **Αρχή**

Ο αλκοολικός τίτλος αλκοολούχων ποτών μπορεί να μετρηθεί με πυκνομετρία και υδροστατικό ζυγό, με βάση την αρχή του Αρχιμήδη, σύμφωνα με την οποία κάθε σώμα βυθιζόμενο σε υγρό δέχεται (κάθετη) άνωση από το υγρό ίση προς το βάρος του εκτοπιζομένου υγρού.

Γ.2. **Εργαστήρια και υλικά**

Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, εκτός εάν άλλως ορίζεται, χρησιμοποιούνται μόνον αντιδραστήρια αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας και νερό βαθμού τουλάχιστον 3, όπως ορίζεται στην προδιαγραφή ISO 3696:1987.

Γ.2.1. Διάλυμα καθαρισμού πλωτήρα (υδροξείδιο του νατρίου, 30 % w/v)

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος, ζυγίζονται 30 g υδροξειδίου του νατρίου και συμπληρώνεται ο όγκος με τη χρησιμοποίηση αιθανόλης 96 % κατ' όγκον.

Γ.3. **Συσκευές και εξοπλισμός**

Συνήθεις εργαστηριακές συσκευές και ειδικότερα τα εξής:

Γ.3.1. Υδροστατικός ζυγός ενός δίσκου με ευαισθησία 1 mg.

Γ.3.2. Πλωτήρας όγκου τουλάχιστον 20 ml, ειδικά προσαρμοσμένος στη ζυγαριά, ανηρτημένος με κλωστή διαμέτρου όχι ανώτερης του 0,1 mm.

Γ.3.3. Ογκομετρικός κύλινδρος με χαραγή. Ο πλωτήρας πρέπει να μπορεί να βυθίζεται τελείως μέσα στον κύλινδρο και κάτω από τη χαραγή ενώ η επιφάνειά του (προς μέτρηση) υγρού πρέπει να διαπεράται μόνο από το νήμα ανάρτησης. Ο ογκομετρικός κύλινδρος πρέπει να έχει εσωτερική διάμετρο μεγαλύτερη από αυτήν του πλωτήρα κατά 6 mm τουλάχιστον.

Γ.3.4. Θερμόμετρο (ή αισθητήρας θερμοκρασίας) βαθμονομημένο σε βαθμούς και δέκατα βαθμού από τους 10 έως τους 40 ºC, βαθμονομημένο έως 0,05 ºC.

Γ.3.5. Βάρη, βαθμονομημένα από αναγνωρισμένο επίσημο φορέα.

Σημείωση 1: Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ζυγός δύο δίσκων· η αρχή περιγράφεται στο κεφάλαιο 1 «Πυκνότητα και ειδικό βάρος» του παραρτήματος του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2676/90 (σ. 7).

Γ.4. **Διαδικασία**

Ο πλωτήρας και ο ογκομετρικός κύλινδρος πρέπει να καθαρίζονται μετά από κάθε μέτρηση με αποσταγμένο νερό, να σπογγίζονται με μαλακό εργαστηριακό χαρτί το οποίο δεν ξεφτίζει και να εκπλένονται με το διάλυμα του οποίου επιδιώκεται η μέτρηση της πυκνότητας. Οι μετρήσεις πρέπει να γίνονται αμέσως μόλις σταθεροποιηθεί η συσκευή, έτσι ώστε να περιορίζονται οι απώλειες της αλκοόλης λόγω εξάτμισης.

Γ.4.1. Βαθμονόμηση του ζυγού

Αν και οι ζυγοί συνήθως έχουν ένα εσωτερικό σύστημα βαθμονόμησης, ο υδροστατικός ζυγός πρέπει να μπορεί να βαθμονομηθεί με βάρη που έχουν ελεγχθεί από επίσημο φορέα πιστοποίησης.

Γ.4.2. Βαθμονόμηση του πλωτήρα

Γ.4.2.1. Ο ογκομετρικός κύλινδρος πληρούται, μέχρι τη χαραγή, με νερό διπλής απόσταξης (ή νερό ισοδύναμης καθαρότητας, π.χ. νερό διηθημένο σε μικρο-φίλτρα, αγωγιμότητας 18,2 MΩ/cm) και σε θερμοκρασία μεταξύ 15 και 25 ºC, αλλά κατά προτίμηση στους 20 ºC.

Γ.4.2.2. Βυθίζεται ο πλωτήρας και το θερμόμετρο, το όλο αναδεύεται, διαβάζεται η ένδειξη της πυκνότητας του υγρού και αν χρεια-

▼B

σθεί διορθώνεται η τιμή έτσι ώστε να ισούται προς αυτήν της πυκνότητας του νερού στη θερμοκρασία της μέτρησης.

Γ.4.3. Έλεγχος με χρήση μείγματος νερού-αλκοόλης.

Γ.4.3.1. Ο ογκομετρικός κύλινδρος πληρούται μέχρι τη χαραγή με μείγμα νερού-αλκοόλης γνωστού τίτλου, σε θερμοκρασία μεταξύ 15 και 25 ºC, αλλά κατά προτίμηση στους 20 ºC.

Γ.4.3.2. Βυθίζεται ο πλωτήρας και το θερμόμετρο, το όλο αναδεύεται, διαβάζεται η ένδειξη της πυκνότητας του υγρού (ή του αλκοολικού τίτλου αναλόγως της συσκευής). Ο αλκοολικός τίτλος που προσδιορίζεται έτσι πρέπει να είναι ίσος προς τον ευρεθέντα προηγουμένως αλκοολικό τίτλο.

Σημείωση 2: Το διάλυμα αυτό με γνωστό τον αλκοολικό τίτλο, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη βαθμονόμηση του πλωτήρα, αντί του δις αποσταγμένου νερού.

Γ.4.4. Μέτρηση της πυκνότητας του αποστάγματος (ή του αλκοολικού του τίτλου, εφόσον το επιτρέπει η συσκευή).

Γ.4.4.1. Το υπό εξέταση δείγμα μεταφέρεται στον ογκομετρικό κύλινδρο, μέχρι τη χαραγή.

Γ.4.4.2. Βυθίζεται ο πλωτήρας και το θερμόμετρο, το όλο αναδεύεται, διαβάζεται η ένδειξη της πυκνότητας του υγρού (ή του αλκοολικού τίτλου αναλόγως της συσκευής). Σημειώνεται η τιμή της θερμοκρασίας, αν η πυκνότητα μετράται σε t ºC (ρ_t).

Γ.4.4.3. Από την πυκνότητα ρ_t προσδιορίζεται δι' αναγωγής η πυκνότητα ρ_{20} με χρησιμοποίηση του πίνακα πυκνοτήτων ρT για μείγματα νερού-αλκοόλης [πίνακας II του παραρτήματος II του εγχειριδίου αναλυτικών μεθόδων OIV (1994), σ. 17-29].

Γ.4.5. Ξεπλένεται ο πλωτήρας και ο ογκομετρικός κύλινδρος.

Γ.4.5.1. Ο ογκομετρικός κύλινδρος πληρούται με το διάλυμα καθαρισμού και βυθίζεται σ' αυτόν ο πλωτήρας.

Γ.4.5.2. Ο πλωτήρας αφήνεται να ξεπλυθεί για μια ώρα, ενώ περιστρέφεται κατά καιρούς.

Γ.4.5.3. Ξεπλένονται με άφθονο νερό βρύσης και μετά με αποσταγμένο νερό.

Γ.4.5.4. Στεγνώνονται με μαλακό εργαστηριακό χαρτί που δεν ξεφτίζει.

Η διαδικασία αυτή ακολουθείται όταν ο πλωτήρας χρησιμοποιείται για πρώτη φορά και κατόπιν τακτικά, όπως προβλέπεται.

Γ.4.6. Αποτελέσματα

Ο αληθής αλκοολικός τίτλος υπολογίζεται από την πυκνότητα ρ_{20} με χρήση των πινάκων που παρουσιάζονται παρακάτω:

Ο πίνακας που παρέχει την τιμή του αλκοολικού τίτλου κατ' όγκο (% vol) στους 20 ºC, συναρτήσει της πυκνότητας στους 20 ºC μειγμάτων νερού-αλκοόλης, είναι ο διεθνής πίνακας που θεσπίστηκε από την International Legal Metrology Organisation, στη σύστασή της με αριθ. 22.

Γ.5. **Χαρακτηριστικά επιδόσεων της μεθόδου (πιστότητα)**

Γ.5.1. Στατιστικά αποτελέσματα διεργαστηριακών δοκιμών

Τα παρακάτω στοιχεία ελήφθησαν από μια διεθνή μελέτη επιδόσεων της μεθόδου με βάση διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες [1] [2].

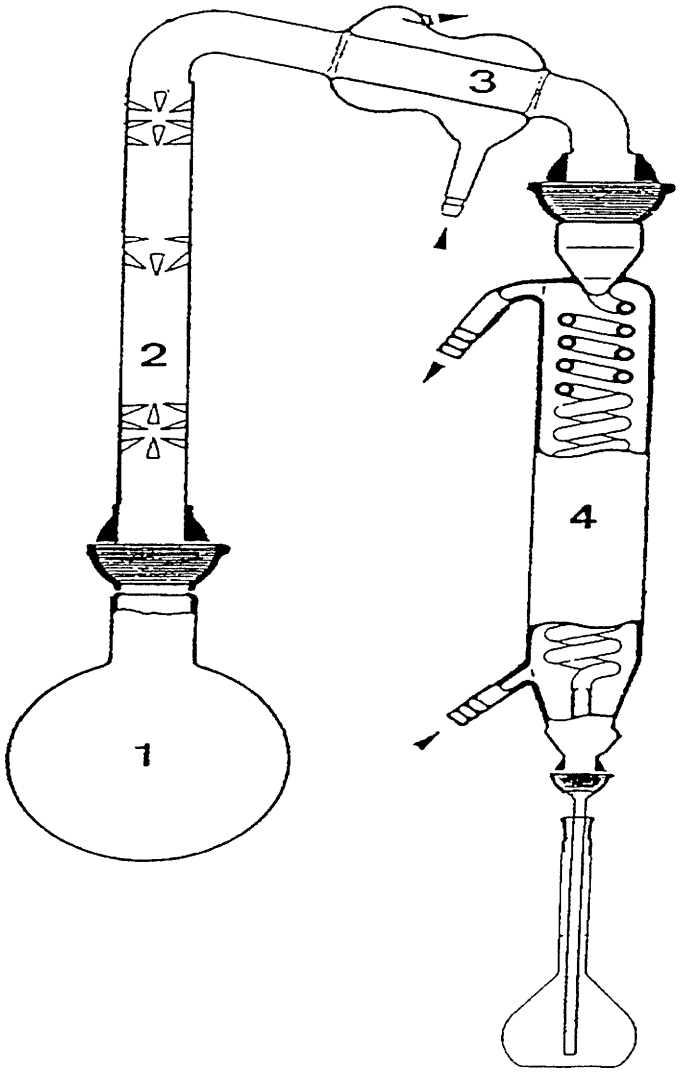
Έτος των διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	12
Αριθμός δειγμάτων	6

▼B

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E	Z
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	12	10	11	12	11	9
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	—	2	1	—	1	2
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	24	20	22	24	22	18
Μέση τιμή ($\bar{x}$) % vol	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (s_r) % vol	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Όριο επαναληψιμότητας (r) % vol	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (s_R) % vol	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) % vol	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Τύποι δειγμάτων:
A Λικέρ φρούτων· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
B Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Γ Ουίσκυ· διπλά τυφλά.
Δ Γκράπα· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
E Ακουαβίτ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
Z Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

▼B



Εικόνα 1. Συσκευή απόσταξης για τη μέτρηση του αληθούς αλκοολικού τίτλου των αλκοολούχων ποτών

1. Σφαιρική φιάλη ενός λίτρου και (τυποποιημένο σφαιρικό) επίθεμα από εσμυρισμένο γυαλί.
2. Στήλη απόσταξης Vigreux των 20 cm.
3. Συμπυκνωτής West με ευθύγραμμο τμήμα μήκους 10 cm.
4. Ψυκτήρας με ελικοειδή σωλήνα των 40 cm.

▼B

II. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΞΗΡΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ ΜΕ ΣΤΑΘΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Ο Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89 παρέχει τη νομική βάση για τη μέθοδο αυτή μόνο για το Ακουαβίτ, στο οποίο το ξηρό εκχύλισμα περιορίζεται σε 15 g/l.

2. **Παραπομπή σε προδιαγραφές**

ISO 3696:1987 Νερό αναλυτικής καθαρότητας — Προδιαγραφές και μέθοδοι ανάλυσης

3. **Ορισμός**

Το ολικό ξηρό εκχύλισμα ή ολικό ξηρό υλικό περιλαμβάνει κάθε υλικό που δεν είναι πτητικό κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

4. **Αρχή**

Ζύγιση του υπολείμματος που απομένει μετά από εξάτμιση του αλκοολούχου ποτού, σε ζέον υδρόλουτρο και ξήρανση σε κλίβανο ξήρανσης.

5. **Συσκευές και εξοπλισμός**

5.1. Κυλινδρική κάψα επίπεδου πυθμένα διαμέτρου 55 mm.

5.2. Ζέον υδρόλουτρο.

5.3. Σιφώνιο 25 ml, κλάση Α.

5.4. Κλίβανος ξήρανσης.

5.5. Ξηραντήρας.

5.6. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 0,1 mg.

6. **Δειγματοληψία και δείγματα**

Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την ανάλυση.

7. **Διαδικασία**

7.1. Μεταφέρονται με σιφώνιο 25 ml αλκοολούχου που περιέχει λιγότερο από 15 g/l ξηράς ουσίας σε μια προζυγισμένη, επίπεδου πυθμένα, κάψα εξάτμισης διαμέτρου 5 mm. Κατά τη διάρκεια της πρώτης ώρας της εξάτμισης η κάψα τοποθετείται στο σκέπασμα ενός ζέοντος υδρόλουτρου, ώστε το υγρό να μην φτάσει σε βρασμό, πράγμα που θα μπορούσε να προκαλέσει απώλειες υγρού. Αφήνεται μια ακόμη ώρα σε κατευθείαν επαφή με τον ατμό του ζέοντος υδρόλουτρου.

7.2. Η διαδικασία ξήρανσης συμπληρώνεται με την εισαγωγή της κάψας σε κλίβανο ξήρανσης στους 105 ºC για δύο ώρες. Η κάψα αφήνεται να κρυώσει σε ξηραντήρα και ζυγίζεται με το περιεχόμενό της.

8. **Υπολογισμοί**

Η μάζα του υπολείμματος πολλαπλασιαζόμενη επί 40 ισούται με το ξηρό εκχύλισμα που περιέχεται στο αλκοολούχο ποτό και εκφράζεται σε g/l με ένα δεκαδικό ψηφίο.

9. **Χαρακτηριστικά επιδόσεων των μεθόδων (πιστότητα)**

9.1. Στατιστικά αποτελέσματα των διεργαστηριακών δοκιμών

Τα παρακάτω στοιχεία ελήφθησαν από μια διεθνή μελέτη επιδόσεων της μεθόδου με διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες [1] [2].

Έτος των διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	10
Αριθμός δειγμάτων	4

▼B

Δείγματα	Α	Β	Γ	Δ
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	9	9	8	9
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	1	1	2	—
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	18	18	16	18
Μέση τιμή ($\bar{x}$) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Τυπική απόκληση επαναληψιμότητας (s_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Σχετική τυπική απόκληση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Όριο επαναληψιμότητας (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Τυπική απόκληση αναπαραγωγιμότητας (s_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Σχετική τυπική απόκληση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Τύποι δειγμάτων:
Α Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Β Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων.
Γ Γκράπα· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων.
Δ Ακουαβίτ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων.

▼B

III. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ ΤΩΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ

III.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. **Ορισμοί**

Στον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89 δίδονται τα ελάχιστα όρια των πτητικών ουσιών, πλην της αιθανόλης και της μεθανόλης, για μια σειρά αλκοολούχων ποτών (ρούμι, αλκοολούχα οινικής προέλευσης, αλκοολούχα προερχόμενα από φρούτα κ.λπ.). Για αυτή μόνον τη σειρά των ποτών, τα όρια αυτά λαμβάνονται συνήθως ίσα με το άθροισμα των συγκεντρώσεων των:

1. πτητικών οξέων εκφραζομένων ως οξικό οξύ·
2. αλδεϋδών εκφραζομένων ως αιθανάλη, από το άθροισμα αιθανάλης (ακεταλδεΰδης) και του κλάσματος αιθανάλης που περιέχεται στο 1,1 - διεθόξυ αιθάνιο (ακετάλη)·
3. εξής ανωτέρων αλκοολών: προπαν-1-όλη, βουταν-1-όλη, βουταν-2-όλη, 2-μεθυλοπροπαν-1-όλη, υπολογιζόμενες ξεχωριστά και 2-μεθυλοβουταν-1-όλη και 3-μεθυλοβουταν-1-όλη, υπολογιζόμενες ξεχωριστά ή σαν άθροισμα·
4. οξικού αιθυλεστέρα.

Συνήθεις μέθοδοι για τη μέτρηση πτητικών ουσιών είναι οι παρακάτω:

— για τα πτητικά οξέα, η μέτρηση της πτητικής οξύτητας,

— για τις αλδεΰδες (αιθανάλη και ακετάλη), τον οξικό αιθυλεστέρα και τις αλκοόλες, η αέρια χρωματογραφία (CPG)

2. **Αέριο χρωματογραφική ανάλυση πτητικών ουσιών**

Η ανάλυση με αέριο χρωματογραφία πτητικών ουσιών άλλων πλην εκείνων που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για τον προσδιορισμό, τόσο της προέλευσης της χρησιμοποιηθείσης πρώτης ύλης κατά την απόσταξη, όσο και για τις εκάστοτε συνθήκες απόσταξης.

Ορισμένα αλκοολούχα περιέχουν άλλα πτητικά συστατικά, όπως αρωματικές ενώσεις, που είναι χαρακτηριστικά της χρησιμοποιηθείσης πρώτης ύλης για την παρασκευή της αλκοόλης, αλλά και χαρακτηριστικά του αρώματος του αλκοολούχου ποτού και των ειδικών συνθηκών της παρασκευής του. Οι ουσίες αυτές είναι σημαντικές για την αξιολόγηση(όσον αφορά στην τήρηση) των απαιτήσεων που τίθενται στον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89.

III.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ: ΑΛΔΕΫΔΕΣ ΑΝΩΤΕΡΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ, ΟΛΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΟΛΗ

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος με τη χρησιμοποίηση της αέριας χρωματογραφίας είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό του 1,1-διαιθοξυαιθανίου (ακετάλης), 2-μεθυλοβουταν-1-όλης (αμυλική αλκοόλης), 3-μεθυλοβουταν-1-όλης (ισοαμυλική αλκοόλης), μεθανόλης (μεθυλική αλκοόλης), αιθανικού αιθυλεστέρα (οξεικού αιθυλεστέρα), βουταν-1-όλης (n-βουτανόλης), βουταν-2-όλης (sec-βουτανόλης), 2-μεθυλοπροπαν-1-όλης (ισοβουτυλική αλκοόλης), προπαν-1-όλης (n-προπανόλης) και αιθανάλης (ακεταλδεΰδης),σε αλκοολούχα ποτά. Στη μέθοδο χρησιμοποιείται (ένα) εσωτερικό πρότυπο, π.χ. η πενταν-3-όλη. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών εκφράζονται σε γραμμάρια ανά 100 λίτρα απόλυτης αλκοόλης. Ο αλκοολικός τίτλος του προϊόντος πρέπει να προσδιοριστεί πριν από την ανάλυση. Τα αλκοολούχα ποτά που μπορούν να αναλυθούν με τη μέθοδο αυτή είναι το ουίσκυ, το μπράντυ, το ρούμι, το απόσταγμα σταφυλιού, τα αποστάγματα φρούτων και το απόσταγμα από στέμφυλα σταφυλιού.

2. **Παραπομπές**

ISO 3696:1987 Νερό εργαστηρίου αναλυτικής καθαρότητας, — Προδιαγραφές και αναλυτική μέθοδος.

▼B

3. **Ορισμός**

Τα πτητικά συστατικά είναι οι πτητικές ουσίες που δημιουργούνται μαζί με την αιθανόλη κατά τη ζύμωση, την απόσταξη και την ωρίμανση των αλκοολούχων ποτών.

4. **Αρχή**

Τα πτητικά συστατικά στα αλκολούχα ποτά προσδιορίζονται με άμεση έγχυση του αλκοολούχου ποτού ή του κατάλληλα αραιωμένου αλκοολούχου ποτού, σε συσκευή αέριας χρωματογραφίας (CPG). Πριν από την έγχυση του αλκοολούχου προστίθεται σ' αυτό το κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο. Τα πτητικά συστατικά διαχωρίζονται με τον κατάλληλο προγραμματισμό θερμοκρασίας στην ενδεδειγμένη στήλη και ανιχνεύονται με χρήση ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Η συγκέντρωση κάθε πτητικού συστατικού προσδιορίζεται σε σχέση προς το εσωτερικό πρότυπο από τους συντελεστές απόκρισης, οι οποίοι λαμβάνονται κατά τη βαθμονόμηση της μεθόδου σύμφωνα με (χρωματογραφικές) συνθήκες παρόμοιες προς αυτές της ανάλυσης του αλκοολούχου ποτού.

5. **Αντιδραστήρια και υλικά**

Εκτός αν άλλως ορίζεται, χρησιμοποιούνται μόνο αντιδραστήρια καθαρότητας ανώτερης του 97 %, διατιθέμενα από προμηθευτή πιστοποιημένο κατά ISO και με πιστοποιητικό καθαρότητας, ελεύθερα από άλλα πτητικά σε συγκεντρώσεις ανάλογες προς τις προσδιοριζόμενες στη μέθοδο (αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί με την έγχυση προτύπων διαλυμάτων των πτητικών συστατικών, συγκεντρώσεων αναλόγων προς τις προσδιοριζόμενες στη μέθοδο και στις κατάλληλες συνθήκες αέριας χρωματογραφίας, όπως στο σημείο 6.4) και μόνο νερό καθαρότητας βαθμού τουλάχιστον 3,όπως ορίζεται στο πρότυπο ISO 3696. Η ακετάλη και η ακεταλδεΰδη φυλάσσονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία μικρότερη των 5 ºC, ενώ όλα τα άλλα αντιδραστήρια φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

5.1. Απόλυτη αιθανόλη (CAS 64-17-5).

5.2. Μεθανόλη (CAS 67-56-1).

5.3. Προπαν-1-όλη (CAS 71-23-8)

5.4. 2-μεθυλοπροπαν-1-όλη (CAS 78-33-1).

5.5. Παραδεκτά εσωτερικά πρότυπα: πενταν-3-όλη (CAS 584-02-1), πενταν-1-όλη (CAS 71-41-0), 4-μεθυλοπενταν-1-όλη (CAS 626-89-1) και νονανοϊκό μεθύλιο (CAS 1731-84-6).

5.6. 2-μεθυλοβουταν-1-όλη (CAS 137-32-6).

5.7. 3-μεθυλοβουταν-1-όλη (CAS 123-51-3).

5.8. Οξικός αιθυλεστέρας (CAS 141-78-6).

5.9. Βουταν-1-όλη (CAS 71-36-3).

5.10. Βουταν-2-όλη (CAS 78-92-2).

5.11. Ακεταλδεΰδη (CAS 75-07-0).

5.12. Ακετάλη (CAS 105-57-7).

5.13. 40 % v/v διάλυμα αιθανόλης.

Για την παρασκευή 400 ml/l διαλύματος αιθανόλης, φέρονται 400 ml αιθανόλης (5.1) σε ογκομετρική φιάλη του 1l, συμπληρώνεται ο όγκος με αποσταγμένο νερό και αναμειγνύονται προσεκτικά.

5.14. Παρασκευή και φύλαξη προτύπων διαλυμάτων (χρησιμοποιούμενη διαδικασία για την αναγνωρισμένη μέθοδο).

Όλα τα πρότυπα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία μικρότερη των 5 ºC και παρασκευάζονται σε μηνιαία βάση, εξαρχής κάθε φορά. Οι μάζες των συστατικών και των διαλυμάτων καταγράφονται με προσέγγιση 0,1 mg.

5.14.1. Πρότυπο διάλυμα- Α

Εισάγονται με σιφώνιο τα ακόλουθα αντιδραστήρια σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml που περιέχει ήδη 60 ml διαλύματος αιθανόλης (5.13) ώστε να αποφεύγεται κατά το δυνατόν η εξάτμιση, συμπληρώνεται ο όγκος με διάλυμα αιθανόλης (5.13) και το όλο αναμειγνύεται προσεκτικά. Καταγράφεται το βάρος

▼B

της φιάλης, το βάρος κάθε προστιθέμενου υλικού και το τελικό συνολικό βάρος του όλου.

Συστατικό	Όγκος (ml)
Μεθανόλη (5.2)	3,0
Προπαν-1-όλη (5.3)	3,0
2-μεθυλοπροπαν-1-όλη (5.4)	3,0
2-μεθυλοβουταν-1-όλη (5.6)	3,0
3-μεθυλοβουταν-1-όλη (5.7)	3,0
Οξεικός αιθυλεστέρας (5.8)	3,0
Βουταν-1-όλη (5.9)	3,0
Βουταν-2-όλη (5.10)	3,0
Ακεταλδεΰδη (5.11)	3,0
Ακετάλη (5.12)	3,0

Σημείωση 1: Η ακετάλη και η ακεταλδεΰδη θα πρέπει να προστίθενται στο τέλος, προκειμένου να ελαχιστοποιούνται οι απώλειες από εξάτμιση.

5.14.2. Πρότυπο διάλυμα — Β

Με σιφώνιο εισάγονται 3 ml πενταν-3-όλης, ή άλλου κατάλληλου εσωτερικού προτύπου (5.5) σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml που περιέχει ήδη περίπου 80 ml διαλύματος αιθανόλης (5.13), συμπληρώνεται ο όγκος με διάλυμα αιθανόλης (5.13) και το όλο αναμειγνύεται προσεκτικά.

Καταγράφεται το βάρος της φιάλης, το βάρος της πενταν-3-όλης ή του άλλου προστεθέντος εσωτερικού προτύπου, καθώς και το τελικό συνολικό βάρος του όλου.

5.14.3. Πρότυπο διάλυμα — Γ

Εισάγονται με σιφώνιο 1 ml διαλύματος Α (5.14.1) και 1 ml διαλύματος Β (5.14.2) σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml που περιέχει ήδη περίπου 80 ml διαλύματος αιθανόλης (5.13), συμπληρώνεται ο όγκος με διάλυμα αιθανόλης (5.13) και το όλο αναμειγνύεται προσεκτικά.

Καταγράφεται το βάρος της φιάλης, το βάρος κάθε προστιθεμένου συστατικού και το τελικό συνολικό βάρος του όλου.

5.14.4. Πρότυπο διάλυμα — Δ

Προκειμένου να διατηρείται η αναλυτική συνέχεια, παρασκευάζεται πρότυπο ελέγχου ποιότητας με την χρησιμοποίηση του προηγουμένως παρασκευασθέντος προτύπου Α (5.14.1). Εισάγονται με σιφώνιο, 1 ml διαλύματος Α (5.14.1) σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml που περιέχει ήδη 80 ml περίπου διαλύματος αιθανόλης (5.13), συμπληρώνεται ο όγκος με διάλυμα αιθανόλης (5.13) και το όλο αναμειγνύεται προσεκτικά.

Καταγράφεται το βάρος της φιάλης, το βάρος κάθε προστιθεμένου συστατικού και το τελικό συνολικό βάρος του όλου.

5.14.5. Πρότυπο διάλυμα — Ε

Εισάγονται με σιφώνιο 10 ml διαλύματος Β (5.14.2) σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml που περιέχει ήδη 80 ml περίπου διαλύματος αιθανόλης (5.13), συμπληρώνεται ο όγκος με διάλυμα αιθανόλης (5.13) και το όλο αναμειγνύεται προσεκτικά.

Καταγράφεται το βάρος της φιάλης, το βάρος κάθε προστιθεμένου συστατικού και το τελικό συνολικό βάρος του όλου.

5.14.6. Πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιούμενα για τον έλεγχο της γραμμικότητας της απόκρισης του ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας.

Σε χωριστές ογκομετρικές φιάλες των 100 ml που περιέχουν 80 ml περίπου αιθανόλης (5.13), εισάγονται με σιφώνιο 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ml διαλύματος Α (5.14.1) και 1 ml διαλύματος Β (5.14.2), συμπληρώνεται ο όγκος με διάλυμα αιθανόλης (5.13) και το όλο αναμειγνύεται προσεκτικά.

▼B

Καταγράφεται το βάρος της φιάλης, το βάρος κάθε προστιθεμένου συστατικού και το τελικό συνολικό βάρος του όλου.

5.14.7. Πρότυπο διάλυμα ελέγχου ποιότητας

Εισάγονται με σιφώνιο 9 ml πρότυπου διαλύματος Δ (5.14.4) και 1 ml πρότυπου διαλύματος Ε (5.14.5) σε ένα μικρό ποτηράκι και αναμειγνύονται προσεκτικά.

Καταγράφεται το βάρος της φιάλης, το βάρος κάθε προστιθεμένου συστατικού και το τελικό συνολικό βάρος του όλου.

6. **Συσκευές και εξοπλισμός**

6.1. Συσκευή κατάλληλη για τη μέτρηση της πυκνότητας και του αλκοολικού τίτλου.

6.2. Αναλυτικός ζυγός, ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

6.3. Αέριος χρωματογράφος με πρόγραμμα θερμοκρασίας εξοπλισμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και ολοκληρωτή ή άλλο σύστημα λήψεως δεδομένων για μετρήσεις εμβαδού και ύψους κορυφών.

6.4. Στήλες αέριας χρωματογραφίας, κατάλληλες για το διαχωρισμό ουσιών, ώστε η ελάχιστη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ μεμονωμένων συστατικών, (άλλων πλην των 2-μεθυλοβουταν-1-όλης και 3-μεθυλοβουταν-1-όλης) να είναι τουλάχιστον 1.3.

Σημείωση 2: Οι ακόλουθες στήλες και συνθήκες αέριας χρωματογραφίας βρέθηκαν κατάλληλες:

1. Στήλη κατακράτησης (προστήλη) του 1 m και εσωτερικής διαμέτρου 0,32 mm, συνδεδεμένη με μια στήλη CP-WAX 57 CB των 50 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,32 mm που περιέχει σταθεροποιημένη πολυαιθυλενογλυκόλη πάχους 0,2 μm και στη συνέχεια με μια στήλη Carbowax 400 των 50 m και εσωτερικής διαμέτρου 0,32 mm, με υλικό πάχους 0,2 μm. (Οι στήλες συνδέονται μεταξύ τους με συνδέσμους κατάλληλους για τη σύνδεση στηλών, όπως π.χ. τύπου «press-fit»).

Φέρον αέριο και πίεση:	Ήλιον (135 kPa)
Θερμοκρασία στήλης:	35 ºC για 17 λεπτά, 35 ºC έως 70 ºC σε 12 ºC/min., σταθερή θερμοκρασία στους 70 ºC για 25 λεπτά.
Θερμοκρασία εισαγωγής:	150 ºC
Θερμοκρασία ανιχνευτή:	250 ºC
Όγκος ενιέμενου δείγματος:	1 μl, split από 20 έως 100:1

2. Στήλη κατακράτησης (προστήλη) του 1 m και εσωτερικής διαμέτρου 0,32 mm, συνδεδεμένη με στήλη CP-WAX 57 CB των 50 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,32 mm, που περιέχει σταθεροποιημένη πολυαιθυλενογλυκόλη πάχους 0,2 μm. (Οι στήλες συνδέονται μεταξύ τους με συνδέσμους κατάλληλους για τη σύνδεση στηλών, όπως π.χ. τύπου «press-fit»).

Φέρον αέριο και πίεση:	Ήλιον (65 kPa)

▼B

Θερμοκρασία στήλης:	35 ºC για 10 min., 35 ºC έως 110 ºC σε 5 ºC/min., 110 ºC έως 190 ºC σε 30 ºC/min., διατηρείται στους 190 ºC για 2 min.
Θερμοκρασία εισαγωγής:	260 ºC
Θερμοκρασία ανιχνευτή:	300 ºC
Όγκος ενιέμενου δείγματος:	1 μl, split 55:1

3. Στήλη πληρωμένη («Packed») (5 % CW 20M, Carbopak B), 2 m και εσωτερικής διαμέτρου 2 mm

Θερμοκρασία στήλης:	65 ºC για 4 min., 65 ºC έως 140 ºC σε 10 ºC/min., διατηρείται στους 140 ºC για 5 min., 140 ºC ως 150 ºC σε 5 ºC/min., διατηρείται σε 150 ºC για 3 min.
Θερμοκρασία εισαγωγής:	65 ºC
Θερμοκρασία ανιχνευτή:	200 ºC
Όγκος ενιέμενου δείγματος:	1 μl

7. **Δειγματοληψία και δείγματα.**

7.1. Εργαστηριακό δείγμα

Κατά την παραλαβή, μετράται ο αλκοολικός τίτλος κάθε δείγματος (6.1).

8. **Διαδικασία (χρησιμοποιούμενη για την αναγνωρισμένη μέθοδο)**

8.1. Εργαστηριακό δείγμα

8.1.1. Ζυγίζεται ένα κατάλληλο σφραγιζόμενο δοχείο και καταγράφεται το βάρος.

8.1.2. Εισάγονται με σιφώνιο 9 ml εργαστηριακού δείγματος στο δοχείο και καταγράφεται το βάρος του όλου ($M_{ΔΕΙΓΜΑ}$).

8.1.3. Προστίθεται 1 ml προτύπου διαλύματος Ε (5.14.5) και καταγράφεται το νέο βάρος ($M_{ΕΠ}$).

8.1.4. Το δείγμα αναδεύεται ζωηρά (τουλάχιστον 20 αναστροφές). Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία μικρότερη των 5 ºC πριν αναλυθούν, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες λόγω εξάτμισης.

8.2. Τυφλό δείγμα

8.2.1. Με τη χρησιμοποίηση ζυγού ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (6.2), ζυγίζεται ένα κατάλληλο σφραγιζόμενο δοχείο και καταγράφεται το βάρος του.

8.2.2. Εισάγονται, με σιφώνιο, σ' αυτό 9 ml από το διάλυμα αιθανόλης των 400 ml/l (5.13) και καταγράφεται το βάρος του όλου.

8.2.3. Προστίθεται 1 ml προτύπου διαλύματος Ε (5.14.5) και καταγράφεται το νέο βάρος.

8.2.4. Το όλον αναδεύεται ζωηρά (τουλάχιστον 20 αναστροφές). Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία μικρότερη των 5 ºC πριν αναλυθούν, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες λόγω εξάτμισης.

▼B

8.3. Προκαταρκτική δοκιμή

Το πρότυπο διάλυμα Γ (5.14.3) ενίεται, προκειμένου να εξασφαλισθεί ότι όλα τα συστατικά διαχωρίζονται με ελάχιστη διαχωριστική ικανότητα 1.3 (εξαιρουμένης της 2- μεθυλοβουταν-1-όλης και της 3-μεθυλοβουταν-1-όλης).

8.4. Βαθμονόμηση

Ελέγχεται η βαθμονόμηση με την εξής διαδικασία: Εξασφαλίζεται το ότι η απόκριση της συσκευής είναι γραμμική, με την ανάλυση, διαδοχικά και εις τριπλούν, των προτύπων διαλυμάτων (5.14.6) που περιέχουν εσωτερικό πρότυπο (ΕΠ). Από τα εμβαδά των κορυφών ή τα ύψη των κορυφών για κάθε (ενιέμενο) διάλυμα υπολογίζεται ο λόγος R για το κάθε πτητικό συστατικό και γίνεται η γραφική παράσταση του R ως προς το λόγο της συγκέντρωσης του κάθε πτητικού συστατικού προς τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου (ΕΠ), Γ. Θα πρέπει τότε να λαμβάνεται ευθεία γραμμή, με συντελεστή συσχέτισης τουλάχιστον 0,99.

$$R = \frac{\text{Εμβαδόν ή ύψος κορυφής πτητικού συστατικού}}{\text{Εμβαδόν ή ύψος κορυφής ΕΠ}}$$

$$\Gamma = \frac{\text{Συγκέντρωση πτητικού συστατικού (μg / g)}}{\text{Συγκέντρωση ΕΠ (μg / g)}}$$

8.5. Προσδιορισμός

Ενίενται το πρότυπο διάλυμα Γ (5.14.3) και 2 πρότυπα διαλύματα ποιοτικού ελέγχου (5.14.7). Στη συνέχεια ενίενται τα άγνωστα δείγματα (που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το 8.1 και 8.2), καθώς και ένα πρότυπο ποιοτικού ελέγχου για κάθε 10 δείγματα, ώστε να εξασφαλίζεται η αναλυτική σταθερότητα. Επίσης, ενίεται και ένα πρότυπο διάλυμα Γ (5.14.3) για κάθε 5 δείγματα.

9. **Υπολογισμός**

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτόματο σύστημα καταγραφής των δεδομένων, αρκεί να είναι εφικτός ο έλεγχος τούτων με βάση τις αρχές που περιγράφονται παρακάτω, στη μέθοδο.

Μετρώνται, είτε τα εμβαδά, είτε τα ύψη των κορυφών των πτητικών, ως και των κορυφών του εσωτερικού προτύπου.

9.1. Υπολογισμός του συντελεστή απόκρισης.

Από το χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος Γ (5.14.3), υπολογίζονται οι συντελεστές απόκρισης της συσκευής για κάθε πτητικό συστατικό, με χρήση της εξίσωσης (1).

(1) $$\text{Συντελεστής απόκρισης} = \frac{\text{Εμβαδόν ή ύψος κορυφής ΕΠ}}{\text{Εμβαδόν ή ύψος κορυφής πτητικού συστατικού}} \times \frac{\text{Συγκέντρωση πτητικού συστατικού (μg / g)}}{\text{Συγκέντρωση ΕΠ (μg / g)}}$$

όπου:

ΕΠ = Εσωτερικό πρότυπο

Συγκέντρωση πτητικού συστατικού = η συγκέντρωση πτητικού συστατικού στο διάλυμα Γ (5.14.3)

Συγκέντρωση ΕΠ = η συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα Γ (5.14.3).

9.1.2. Ανάλυση δείγματος

Με χρήση της παρακάτω εξίσωσης (2), υπολογίζεται η συγκέντρωση του κάθε πτητικού συστατικού στα δείγματα.

▼B

(2) Συγκέντρωση πτητικού συστατικού, (μg/g) =

$$\frac{\text{Εμβαδόν ή ύψος κορυφής πτητικού συστατικού}}{\text{Εμβαδόν ή ύψος κορυφής ΕΠ}} \times \frac{M_{ΕΠ}\ (g)}{M_{ΔΕΙΓΜΑ}\ (g)} \times \text{Συγκέντρωση ΕΠ (μg / g)} \times RF$$

όπου:

$M_{ΔΕΙΓΜΑ}$ = βάρος δείγματος (8.1.2)·

$M_{ΕΠ}$ = βάρος εσωτερικού προτύπου (8.1.3)·

$Συγκέντρωση_{ΕΠ}$ = συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα Ε (5.14.5)·

RF = συντελεστής απόκρισης, υπολογιζόμενος, από την εξίσωση 1.

9.1.3. Ανάλυση του προτύπου ποιοτικού ελέγχου

Με χρήση της παρακάτω εξίσωσης (3), υπολογίζεται η ανάκτηση τοις % επί της τιμής στόχου (επιθυμητής τιμής), για κάθε πτητικό συστατικό στα πρότυπα διαλύματα ποιοτικού ελέγχου (ΠΕ) (5.14.7):

$$(3)\ \%\ \text{ανάκτηση του δείγματος ΠΕ} = \frac{\text{συγκέντρωση της ουσίας στο πρότυπο ΠΕ}}{\text{συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα Δ}} \times 100$$

Η συγκέντρωση της ουσίας στο πρότυπο ΠΕ υπολογίζεται με χρήση των παραπάνω εξισώσεων (1) και (2).

9.2. Τελική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα, προκειμένου για τα δείγματα, εκφράζονται σε g ανά 100 λίτρα απόλυτης αλκοόλης, εκ μετατροπής από μg/g, μέσω της εξίσωσης (4):

(4) Συγκέντρωση σε g ανά 100 λίτρα απόλυτης αλκοόλης =

$$\text{Συγκέντρωση (μg / g)} \times \rho \times 10/[\text{αλκοολικός τίτλος (\% vol)} \times 1\ 000]$$

όπου

ρ = πυκνότητα σε kg/m^2.

Τα αποτελέσματα θα παρουσιάζονται με τρία, το πολύ, σημαντικά ψηφία εκ των οποίων ένα δεκαδικό το ανώτερο, π.χ. 11,4 g ανά 100 l απόλυτης αλκοόλης.

10. **Διασφάλιση και έλεγχος ποιότητας (χρησιμοποιούνται για την αναγνωρισμένη μέθοδο)**

Χρησιμοποιώντας την παραπάνω εξίσωση (2), υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε πτητικού συστατικού στα πρότυπα διαλύματα ελέγχου ποιότητας που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις διαδικασίες 8.1.1 έως 8.1.4. Με χρήση της εξίσωσης (3), υπολογίζεται η τοις % ανάκτηση επί της τιμής στόχου. Αν, για κάθε πτητικό συστατικό, τα ευρισκόμενα αποτελέσματα κυμαίνονται εντός του ± 10 % των θεωρητικών τους τιμών, η ανάλυση μπορεί να συνεχιστεί. Αν όχι, θα πρέπει να γίνει έρευνα για να ευρεθεί η αιτία των σφαλμάτων και να ακολουθήσει η ενδεδειγμένη διορθωτική ενέργεια.

11. **Χαρακτηριστικά επιδόσεων της μεθόδου (πιστότητα)**

Στατιστικά αποτελέσματα των διεργαστηριακών δοκιμών. Οι παρακάτω πίνακες καταγράφουν τις τιμές των εξής ουσιών: αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, ακετάλη, ολική αιθανόλη, μεθανόλη, βουταν-2-όλη, προπάν-1-όλη, βουτάν-1-όλη, 2-μεθανολ-1-όλη, 2 μεθυλοβουτάν-1-όλη, 3 μεθυλοβουταν-1-όλη.

Τα παρακάτω στοιχεία ελήφθησαν από μια διεθνή μελέτη επιδόσεων της μεθόδου με διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες.

▼B

Έτος των διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	αιθανάλη

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	28	26	27	27	28
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	2	4	3	3	2
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	56	52	54	54	56
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8 (*)	28,6 52,2 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (s_r) μg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Σχετική τυπική απόκληση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (s_R) μg/g	12	14	22	6,8	8,9
Σχετική τυπική απόκληση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Τύπος δειγμάτων:
A Μπράντυ· διπλά τυφλά.
B Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
E Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος των διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία	οξικός αιθυλεστέρας

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	24	24	25	24	24
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	2	2	1	2	2
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	48	48	50	48	48
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)
Τυπική απόκληση επαναληψιμότητας (s_r) μg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4

▼B

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (s_R) μg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Όριο αναπαραγωγικότητας (R) μg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Τύπος δειγμάτων:
A Μπράντυ· διπλά τυφλά.
B Κρίς· διπλά τυφλά.
Γ Γκραμπα· διπλά τυφλά..
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
E Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	ακετάλη

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	20	21	22	17	21
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	4	3	2	4	3
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	40	42	44	34	42
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60 (*)	15,1 28,3 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Τύπος δειγμάτων:
A Μπράντυ· διπλά τυφλά.
B Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
E Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος των διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	ολική αιθανάλη

▼B

Δείγματα	Α	Β	Γ	Δ	Ε
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	23	19	22	21	22
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων	1	5	2	3	2
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	46	38	44	42	44
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8 (*)	32,7 61,8 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Τύπος δειγμάτων:
Α Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Β Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
Ε Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	μεθανόλη

Δείγματα	Α	Β	Γ	Δ	Ε
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	26	27	27	28	25
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	4	3	3	1	4
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	52	54	54	56	50
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	13	99	60	4,5	2,8
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8

▼B

Δείγματα	Α	Β	Γ	Δ	Ε
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Τύπος δειγμάτων:
Α Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Β Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
Ε Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	4
Ουσία:	βουταν-2-όλη

Δείγματα	Α	Β	Γ	Ε
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	21	27	29	22
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	4	3	1	3
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	42	54	58	44
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	0,89	13	3,2	0,87
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Τύπος δειγμάτων:
Α Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Β Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Ε Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	προπαν-1-όλη

Δείγματα	Α	Β	Γ	Δ	Ε
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	29	27	27	29	29
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	2	4	3	2	2

▼B

Δείγματα	Α	Β	Γ	Δ	Ε
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	58	54	54	58	58
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Τύπος δειγμάτων:
Α Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Β Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
Ε Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	βουταν-1-όλη

Δείγματα	Α	Β	Γ
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	20	22	22
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	4	4	6
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	40	44	44
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	3,79	5,57	7,54
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	0,43	0,20	0,43
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	1,1	0,6	1,2
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	0,59	0,55	0,82
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	1,7	1,5	2,3

Τύπος δειγμάτων:
Α Μπράντυ· διπλά τυφλά.
Β Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά (*).

▼B

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	2-μεθυλοπροπαν-1-όλη

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	28	31	30	26	25
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	3	0	1	5	6
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	56	62	60	52	50
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	174,2	111,7	185,0	291,0 246,8 (*)	115,99 133,87 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Τύπος δειγμάτων:
A Μπράντυ· διπλά τυφλά.
B Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
E Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	2-μεθυλοβουταν-1-όλη

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	25	26	25	27	25
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	3	2	3	1	2
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	50	52	50	54	50
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2 (*)	39,5 61,5 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5

▼B

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Τύπος δειγμάτων:
A Μπράντυ· διπλά τυφλά.
B Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
E Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1997
Αριθμός εργαστηρίων	32
Αριθμός δειγμάτων	5
Ουσία:	3-μεθυλοβουταν-1-όλη

Δείγματα	A	B	Γ	Δ	E
Αριθμός προκριθέντων εργαστηρίων (παραλείπονται εσφαλμένα αποτελέσματα)	23	23	24	27	21
Αριθμός εσφαλμένων αποτελεσμάτων (εργαστήρια)	5	5	4	1	6
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	46	46	48	54	42
Μέση τιμή ($\bar{x}$) μg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) μg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Όριο επαναληψιμότητας (r) μg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) μg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) μg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Τύπος δειγμάτων:
A Μπράντυ· διπλά τυφλά.
B Κίρς· διπλά τυφλά.
Γ Γκράπα· διπλά τυφλά.
Δ Ουίσκυ· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).
E Ρούμι· διπλά διαφορετικών συγκεντρώσεων (*).

▼M1

V. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΗΣ trans-ΑΝΗΘΟΛΗΣ ΣΤΑ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της trans-ανηθόλης σε αρωματισμένα με άνισο αλκοολούχα ποτά χρησιμοποιείται δε κατ' αυτήν αέρια χρωματογραφία με τριχοειδή στήλη.

2. **Σχετικά πρότυπα**

ISO 3696: 1987 Νερό αναλυτικής καθαρότητας — Προδιαγραφές και μέθοδοι ανάλυσης.

3. **Αρχή**

Η συγκέντρωση της trans-ανηθόλης στο ποτό προσδιορίζεται με αέριο χρωματογραφία (GC). Στο υπό ανάλυση δείγμα ως και σε διάλυμα αναφοράς trans-ανηθόλης γνωστής συγκεντρώσεως, προστίθεται η ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου, π.χ. 4-αλλυλανισόλη (εστραγκόλη), εφόσον η εστραγκόλη δεν περιέχεται εκ φύσεως στο δείγμα. Στη συνέχεια, και τα δύο αραιώνονται με διάλυμα αιθανόλης 45 % και εγχύονται απευθείας στον αέριο χρωματογράφο. Προκειμένου για αλκοολούχα ποτά υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα, είναι απαραίτητη η εκχύλιση πριν από την προετοιμασία και την ανάλυση του δείγματος.

4. **Αντιδραστήρια και υλικά**

Κατά την ανάλυση, χρησιμοποιούνται αποκλειστικώς αντιδραστήρια καθαρότητας τουλάχιστον 98 %. Πρέπει να χρησιμοποιείται νερό βαθμού καθαρότητας τουλάχιστον όπως ορίζεται στο ISO 3696.

Τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε ψυχρό περιβάλλον (περίπου 4 ºC), μακριά από το φως, σε περιέκτες από αλουμίνιο ή σε φαιοκίτρινες γυάλινες φιάλες (amber). Τα πώματα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι επικαλυμμένα με αλουμίνιο. Αν η trans-ανηθόλη βρίσκεται στην κρυσταλλική της μορφή, τότε πρέπει να τακεί μέχρι θερμοκρασίας δωματίου, αλλά σε καμιά περίπτωση η θερμοκρασία της δεν πρέπει να ξεπεράσει τους 35 ºC.

4.1. Αιθανόλη 96 % vol. (CAS 64-17-5)

4.2. 1-μεθοξυ-4- (1-προπενυλο) βενζόλιο (trans-ανηθόλη) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-αλλυλανισόλη (εστραγκόλη) (CAS 140-67-0), συνιστώμενο εσωτερικό πρότυπο (IS)

4.4. Αιθανόλη 45 % vol.

Προστίθενται 560 g απεσταγμένου νερού σε 378 g αιθανόλης 96 % vol.

4.5. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Όλα τα πρότυπα διαλύματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15-35 ºC), μακριά από το φως, σε περιέκτες από αλουμίνιο ή σε γυάλινες αδιαφανείς φιάλες. Το πώμα θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι επικαλυμμένο με αλουμίνιο.

Η trans-ανηθόλη και η 4-αλλυλανισόλη είναι πρακτικώς αδιάλυτες σε νερό και, κατά συνέπεια, πρέπει να διαλύονται σε μικρή ποσότητα αιθανόλης 96 % vol. (4.1), πριν από την προσθήκη της αιθανόλης 45 % vol. (4.4).

Τα αρχικά διαλύματα πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευαζόμενα προς τούτο κάθε εβδομάδα.

4.5.1. Πρότυπο διάλυμα Α

Αρχικό διάλυμα trans-ανηθόλης (συγκέντρωση: 2 g/l)

40 ml trans-ανηθόλης (4.2) ζυγίζονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml (ή 400 mg σε 200 ml, κ.λπ.). Προστίθεται μικρή ποσότητα αιθανόλης 96 % (4.1), ο όγκος συμπληρώνεται, μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) και το διάλυμα αναμειγνύεται καλώς.

▼M1

4.5.2. Εσωτερικό πρότυπο διάλυμα B

Αρχικό διάλυμα εσωτερικού προτύπου, π.χ. εστραγκόλη (συγκέντρωση: 2 g/l)

Σε ογκομετρική φιάλη 20 ml (ή 400 mg σε 200 ml, κ.λπ.), ζυγίζονται 40 mg εστραγκόλης (4.3). Προστίθεται ποσότητα αιθανόλης 96 % vol. (4.1), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) και αναμειγνύεται επιστα-μένως.

4.5.3. Διαλύματα, που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της απόκρισης γραμμικότητας της απόκρισης του ανιχνευτή ιονι-σμού φλόγας (FID)

Η γραμμικότητα της απόκρισης του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) πρέπει να ελέγχεται κατά την ανάλυση, για το εύρος περιοχής συγκεντρώσεων της trans-ανηθόλης στα αλκοολούχα ποτά από 0 g/l και 2,5 g/l. Στη διαδικασία της ανάλυσης, τα προς ανάλυση άγνωστα δείγματα των αλκοολούχων ποτών αραιώνονται 10 φορές (8.3). Υπό τις αναλυτικές συνθήκες της μεθόδου, αρχικά διαλύματα που αντιστοιχούν σε συγκεντρώ-σεις trans-ανηθόλης στο προς ανάλυση δείγμα, 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 και 0,25 g/l, παρασκευάζονται ως ακολούθως: λαμβά-νονται με σιφώνιο 0,5, 1, 1,5, 2 και 2,5 ml από το αρχικό διάλυμα A (4.5.1) και φέρονται αντιστοίχως σε τέσσερις ογκο-μετρικές φιάλες των 20 ml. Σε κάθε φιάλη φέρονται με σιφώνιο 2 ml εσωτερικού προτύπου διαλύματος B (4.5.2) ο όγκος συμπληρώνεται, μέχρι τη χαραγή, με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) και το διάλυμα αναμειγνύεται καλώς.

Τα τυφλά διαλύματα (8.4) χρησιμοποιούνται όπως το διάλυμα με συγκέντρωση 0 g/l.

4.5.4. Πρότυπο διάλυμα C

2 ml πρότυπου διαλύματος A (4.5.1) μεταφέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml. Προστίθενται 2 ml εσωτε-ρικού πρότυπου διαλύματος B (4.5.2), ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) και το διάλυμα αναμειγνύεται καλώς.

5. **Συσκευές και εξοπλισμός**

5.1. Αέριος χρωματογράφος με τριχοειδή στήλη εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) και ολοκληρωτή ή οποιοδή-ποτε άλλο σύστημα επεξεργασίας δεδομένων με το οποίο να μπορούν να μετρώνται ύψη ή εμβαδά κορυφών, ως και με αυτό-ματο δειγματολήπτη ή χειροκίνητο σύστημα εισαγωγής δείγματος (manual sample injection).

5.2. Εισαγωγέας «Split/Splitless»

5.3. Τριχοειδής στήλη με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά, ενδει-κτικώς:

μήκος: 50 m,

εσωτερική διάμετρος: 0,32 mm,

πάχος φιλμ: 0,2 μm,

στατική φάση: FFAP — πορώδες πολυμερές τροποποιημένης TPA πολυαιθυλενογλυκόλης διασταυρούμενης σύνδεσης.

5.4. Κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός: ογκομετρικά γυάλινα σκεύη ποιότητας A, αναλυτικός ζυγός (ακρίβεια: ± 0,1 mg).

6. **Χρωματογραφικές συνθήκες**

Ο τύπος και οι διαστάσεις της στήλης, καθώς και οι χρωματο-γραφικές συνθήκες, πρέπει να είναι τέτοιες ώστε η ανηθόλη και το εσωτερικό πρότυπο να διαχωρίζονται μεταξύ τους ως και από κάθε άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Οι τυπικές συνθήκες αεριοχρωματογραφίας για την ενδεικτικά αναφερό-μενη στην παράγραφο 5.3 τριχοειδή στήλη είναι:

6.1. Φέρον αέριο: ήλιο αναλυτικής καθαρότητας.

6.2. Ταχύτητα ροής: 2 ml/min

6.3. Θερμοκρασία εισαγωγέα: 250 ºC.

6.4. Θερμοκρασία ανιχνευτή: 250 ºC.

▼**M1**

6.5. Συνθήκες θερμοκρασίας κλιβάνου: ισοθέρμως στους 180 ºC επί 10 λεπτά

6.6. Όγκος ένεσης: 1 μl, split 1:40

7. **Δείγματα**

Τα δείγματα δεν πρέπει να ψύχονται αλλά να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο θερμοκρασίας δωματίου.

8. **Διαδικασία**

8.1. Έλεγχος του δείγματος για τυχόν παρουσία εστραγκόλης

Για να διασφαλίζεται ότι το δείγμα δεν περιέχει εκ φύσεως εστραγκόλη πρέπει να γίνεται ανάλυση χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε εσωτερικού προτύπου. Εάν βρεθεί ενυπάρχουσα εκ φύσεως εστραγκόλη, τότε πρέπει να επιλέγεται κάποιο άλλο εσωτερικό πρότυπο (για παράδειγμα μενθόλη).

2 ml δείγματος φέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml, ο όγκος συμπληρώνεται, μέχρι τη χαραγή, με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) και το διάλυμα αναμειγνύεται καλώς.

8.2. Παρασκευή άγνωστων δειγμάτων

2 ml δείγματος φέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml, στη συνέχεια προστίθενται 2 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου B (4.5.2), ο όγκος συμπληρώνεται, μέχρι τη χαραγή, με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) και το διάλυμα αναμειγνύεται καλώς.

8.3. Τυφλό

2 ml εσωτερικού προτύπου διαλύματος B (4.5.2) φέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη 20 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) και αναμειγνύεται επισταμένως.

8.4. Έλεγχος γραμμικότητας

Πριν από την έναρξη της ανάλυσης, πρέπει να ελέγχεται η γραμμικότητα της απόκρισης του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) με ανάλυση, διαδοχικά, καθενός από τα πρότυπα διαλύματα ελέγχου γραμμικότητας εις τριπλούν (4.5.3).

Από την ολοκλήρωση του εμβαδού ή του ύψους των κορυφών κάθε ένεσης, κατασκευάζεται διάγραμμα της συγκέντρωσης σε g/l συναρτήσει του R, για κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα.

Όπου

R = ύψος ή εμβαδόν της κορυφής της trans-ανηθόλης δια του ύψους ή του εμβαδού της κορυφής της εστραγκόλης.

Ως γραφική παράσταση πρέπει να λαμβάνεται ευθεία γραμμή.

8.5. Προσδιορισμός

Εγχύεται το τυφλό διάλυμα (8.3), ακολούθως εγχύεται το πρότυπο διάλυμα C (4.5.4) και ένα από τα πρότυπα ελέγχου γραμμικότητας (4.5.3), το οποίο χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου ποιότητας (επιλέγεται εκείνο στο οποίο η συγκέντρωση της trans-ανηθόλης είναι παραπλήσια εκείνης στο άγνωστο). Ακολούθως εγχύονται 5 άγνωστα δείγματα (8.2). Προκειμένου να επιβεβαιώνεται η αναλυτική σταθερότητα, παρεμβάλλεται, ανά πέντε άγνωστα δείγματα, ένα δείγμα από το διάλυμα ελέγχου ποιότητας.

9. **Υπολογισμός του συντελεστή απόκρισης**

Μετρώνται είτε τα εμβαδά των κορυφών (χρησιμοποιώντας ολοκληρωτή ή σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων), είτε τα ύψη των κορυφών (ολοκλήρωση δια χειρός) της trans-ανηθόλης και του εσωτερικού προτύπου.

9.1. Υπολογισμός του συντελεστή απόκρισης (RFi)

Ο συντελεστής απόκρισης υπολογίζεται ως εξής:

RFi = (Ci/εμβαδόν ή ύψοςi)*(εμβαδόν ή ύψοςis/Cis)

▼M1

Όπου:

C_i είναι η συγκέντρωση της trans-ανηθόλης στο πρότυπο διάλυμα A (4.5.1)

C_{is} είναι η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στο πρότυπο διάλυμα B (4.5.2)

$έμβαδόν_i$ είναι το εμβαδόν (ή το ύψος) της κορυφής της trans-ανηθόλης

$έμβαδόν_{is}$ είναι το εμβαδόν (ή το ύψος) της κορυφής του εσωτερικού προτύπου

RF_i υπολογίζεται από τα 5 δείγματα του διαλύματος C (4.5.4).

9.2. Ανάλυση των διαλυμάτων ελέγχου γραμμικότητας της απόκρισης

Εγχύονται τα διαλύματα ελέγχου γραμμικότητας της απόκρισης (4.5.3).

9.3. Ανάλυση του δείγματος

Εγχύεται το διάλυμα του άγνωστου δείγματος (8.2).

10. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η συγκέντρωση της trans-ανηθόλης υπολογίζεται με τη χρησιμοποίηση του τύπου:

ci = Cis * (εμβαδόν ή ύψοςi/εμβαδόν ή ύψοςis)*RFi

Όπου:

c_i είναι η άγνωστη συγκέντρωση της trans-ανηθόλης

C_{is} είναι η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στο άγνωστο (4.5.2)

Εμβαδόν ή $ύψος_i$ είναι το εμβαδόν ή ύψος της κορυφής της trans-ανηθόλης

Εμβαδόν ή $ύψος_{is}$ είναι το εμβαδόν ή ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου

RF_i είναι ο συντελεστής απόκρισης (υπολογιζόμενος όπως στο 9.1)

Η συγκέντρωση της trans-ανηθόλης εκφράζεται σε γραμμάρια ανά λίτρο, με ένα δεκαδικό ψηφίο.

11. **Διασφάλιση και έλεγχος ποιότητας**

Τα χρωματογραφήματα πρέπει να είναι τέτοιας μορφής ώστε η ανηθόλη και το εσωτερικό πρότυπο να διαχωρίζονται μεταξύ τους ως και από οποιαδήποτε άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Η τιμή RF_i υπολογίζεται από τα αποτελέσματα που αντιστοιχούν σε πέντε ενέσεις του διαλύματος C (4.5.4). Εάν ο συντελεστής διακύμανσης [CV % = (τυπική απόκλιση/μέση τιμή)* 100] είναι μεταξύ – 1 % και + 1 %, η μέση τιμή RF_i είναι αποδεκτή.

Η ανωτέρω εξίσωση πρέπει να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της trans-ανηθόλης στο δείγμα ελέγχου ποιότητας που επιλέγεται από τα διαλύματα ελέγχου της γραμμικότητας (4.5.3).

Αν ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του επιλεγμένου διαλύματος ελέγχου γραμμικότητας που επιλέχτηκε ως εσωτερικό διάλυμα εσωτερικού ελέγχου (quality control solution) ευρίσκεται στην περιοχή με εύρος, ως προς τη θεωρητική τιμή του διαλύματος, ± 2,5 % αυτής, τότε τα αποτελέσματα των αγνώστων δειγμάτων γίνονται αποδεκτά.

12. **Προετοιμασία δείγματος αλκοολούχου ποτού που περιχει μεγάλη ποσότητα ζάχαρης και δείγματος λικέρ πριν από την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία**

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της trans-ανηθόλης με αέριο χρωματογραφία με τριχοειδή στήλη σε αλκοολούχα ποτά με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, γίνεται προηγουμένως εκχύλιση της αλκοόλης από αυτά.

▼**M1**

12.1. Αρχή

Λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα του δείγματος λικέρ, στην οποία προστίθεται το εσωτερικό πρότυπο, σε συγκέντρωση παρόμοια με εκείνη της προς προσδιορισμό ουσίας (trans-ανηθόλης) στο λικέρ. Προστίθενται δωδεκαένυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο και άνυδρο θειικό αμμώνιο. Το προκύπτον μείγμα ανακινείται καλά και ψύχεται, οπότε σχηματίζονται δύο στιβάδες. Παρεμβάλλεται η ανώτερη (αλκοολική) στιβάδα. Λαμβάνεται μέρος της αλκοολικής αυτής στιβάδας και αραιώνεται με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) (σημείωση: στο στάδιο αυτό δεν προστίθεται εσωτερικό πρότυπο, διότι έχει ήδη προστεθεί). Το προκύπτον διάλυμα αναλύεται με αέριο χρωματογραφία.

12.2. Αντιδραστήρια και υλικά

Για την εκχύλιση χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια καθαρότητας άνω του 99 %.

12.2.1. Θειικό αμμώνιο, άνυδρο (CAS 7783-20-2)

12.2.2. Δωδεκαένυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο (CAS 10039-32-4)

12.3. Συσκευές και εξοπλισμός

Κωνικές φιάλες, διαχωριστικές χοάνες, ψύκτης.

12.4. Διαδικασία

12.4.1. Έλεγχος του δείγματος για τυχόν ύπαρξη εστραγκόλης

Για να διασφαλίζεται ότι το δείγμα δεν περιέχει εκ φύσεως εστραγκόλη, πρέπει να γίνεται εκχύλιση (12.4.2) και ανάλυση τυφλού δείγματος χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε εσωτερικού προτύπου. Εάν βρεθεί ενυπάρχουσα εκ φύσεως εστραγκόλη, τότε πρέπει να επιλεγεί κάποιο άλλο εσωτερικό πρότυπο.

12.4.2. Εκχύλιση

5 ml αιθανόλης 96 % (4.1) φέρονται με σιφώνιο σε κωνική φιάλη, ζυγίζονται σ' αυτή 50 mg εσωτερικού προτύπου (4.3) και προστίθενται 50 ml από το δείγμα. Προστίθενται 12 g άνυδρου θειικού αμμωνίου (12.2.1) και 8.6 g δωδεκαένυδρου μονόξινου φωσφορικού νατρίου (12.2.2). Η κωνική φιάλη πωματίζεται.

Η φιάλη ανακινείται για 30 λεπτά τουλάχιστον. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί συσκευή που αναδεύει με μηχανικό τρόπο. Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαγνητικός αναδευτήρας, που είναι επικαλυμμένος με teflon, καθ' όσον το teflon απορροφά μέρος της προσδιοριζόμενης ουσίας. Σημειώνεται ότι τα προστιθέμενα άλατα δεν διαλύονται πλήρως.

Η πωματισμένη φιάλη τοποθετείται σε ψυγείο (T < 5 ºC) επί δύο ώρες τουλάχιστον.

Μετά την παρέλευση του χρονικού αυτού διαστήματος, πρέπει να υπάρχουν δύο ξεχωριστές υγρές στιβάδες και ένα στερεό υπόλειμμα. Η αλκοολική στιβάδα πρέπει να είναι διαυγής. Εάν δεν είναι, η φιάλη επαναφέρεται στο ψυγείο μέχρι να επιτευχθεί σαφής διαχωρισμός των δύο στοιβάδων.

Όταν διαυγαστεί η αλκοολική στιβάδα, λαμβάνεται μέρος αυτής (π.χ. 10 ml), με προσοχή ώστε να μην αναταραχθεί η υδατική στιβάδα, τοποθετείται σε φαιοκίτρινο φιαλίδιο το οποίο κλείνεται ερμητικά.

12.4.3. Προετοιμασία του εκχυλίσματος του δείγματος, προς ανάλυση

Το εκχύλισμα (12.4.2) αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Λαμβάνονται με σιφώνιο 2 ml του, σε θερμοκρασία δωματίου, αλκοολικού εκχυλίσματος και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 45 % (4.4) και το όλον αναμειγνύεται καλώς.

12.5. Προσδιορισμός

Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 8.5 ανωτέρω.

▼**M1**

12.6. Υπολογισμός των Αποτελεσμάτων

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο τύπος:

Ci = (mis/V)*(εμβαδόνi/εμβαδόνis)*RFi

Όπου:

m_{is} είναι το βάρος (12.4.2) του εσωτερικού προτύπου (4.3) που προστέθηκε σε mgr.

V είναι ο όγκος του άγνωστου δείγματος (50 ml)

RF_i είναι ο συντελεστής απόκρισης (9.1)

$εμβαδόν_i$ είναι το εμβαδόν της κορυφής της trans-ανηθόλης

$εμβαδόν_{is}$ είναι το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε γραμμάρια ανά λίτρο με ένα δεκαδικό ψηφίο.

12.7. Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας

Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 11 ανωτέρω.

13. **Χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου (πιστότης)**

Στατιστικά αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής:

Στους πίνακες που ακολουθούν δίδονται οι τιμές για την ανηθόλη.

Τα δεδομένα που ακολουθούν ελήφθησαν από διεθνή μελέτη για την απόδοση της μεθόδου, που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες.

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1998
Αριθμός εργαστηρίων	16
Αριθμός δειγμάτων	10
Αναλύτης	ανηθόλη

Pastis:

Δείγματα	A	B	C	D	E	F
Αριθμός εργαστηρίων μετά την αφαίρεση των αποκλινουσών τιμών	15	15	15	13	16	16
Αριθμός αποκλινουσών τιμών (εργαστήρια)	1	1	1	3	—	—
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	30	30	30	26	16	16
Μέση τιμή g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Όριο επαναληψιμότητας (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Τύποι δειγμάτων:

A pastis, τυφλά εις διπλούν

▼**M1**

B pastis, τυφλά εις διπλούν

C pastis, τυφλά εις διπλούν

D pastis, τυφλά εις διπλούν

E pastis, μονό εις απλούν

F pastis, μονό εις απλούν

Άλλα αρωματισμένα με άνισο αλκοολούχα ποτά:

Δείγματα	G	H	I	J
Αριθμός εργαστηρίων μετά την αφαίρεση των αποκλινουσών τιμών	16	14	14	14
Αριθμός αποκλινουσών τιμών (εργαστήρια)	—	2	1	1
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	32	28	28	28
Μέση τιμή g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Όριο επαναληψιμότητας (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Τύποι δειγμάτων:

G ούζο, επίπεδα split (*)

H anis, τυφλά εις διπλούν

I λικέρ αρωματισμένο με άνισο, εις διπλούν

J λικέρ αρωματισμένο με άνισο, εις διπλούν

▼M1

VI. ΓΛΥΚΥΡΡΙΖΙΚΟ ΟΞΥ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΥΡΡΙΖΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό του γλυκυρριζικού οξέος στα αρωματισμένα με άνισο αλκοολούχα ποτά και χρησιμοποιείται κατ' αυτήν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89 ορίζει ότι κάθε αρωματισμένο με άνισο αλκοολούχο ποτό με την επωνυμία «pastis» πρέπει να περιέχει γλυκυρρυζικό οξύ σε συγκέντρωση μεταξύ 0,05 και 0,5 γραμμαρίων ανά λίτρο.

2. **Σχετικά πρότυπα**

ISO 3696: 1987 Νερό αναλυτικής καθαρότητας — Προδιαγραφές και μέθοδοι ανάλυσης.

3. **Αρχή**

Η περιεκτικότητα σε γλυκυρριζικό οξύ προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανίχνευση υπεριωδών ακτινών. Το πρότυπο διάλυμα και το προς ανάλυση δείγμα διηθούνται και εγχύονται ξεχωριστά απευθείας στο σύστημα της HPLC.

4. **Αντιδραστήρια και υλικά**

Κατά την ανάλυση, χρησιμοποιούνται μόνον αντιδραστήρια κατάλληλης καθαρότητας για HPLC, απόλυτη αιθανόλη και νερό βαθμού καθαρότητας 3 όπως ορίζεται στο ISO 3696.

4.1. Αιθανόλη 96 % vol. (CAS 64-17-5)

4.2. Γλυκυρριζινικό αμμώνιο, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (άλας αμμωνίου του γλυκυρριζικού οξέος)

(M.B. 839.98) (CAS 53956-04-0): καθαρότητα τουλάχιστον 90 %.

(M.B. γλυκυρριζικού οξέος: 822.94)

4.3. Παγόμορφο οξικό οξύ, CH_3COOH (CAS 64-19-7)

4.4. Μεθανόλη, CH_3OH (CAS 67-56-1)

4.5. Αιθανόλη 50 % vol.

Για την παρασκευή 1 000 ml (σε 20 ºC) χρησιμοποιούνται:

— αιθανόλη 96 % vol. (4.1): 521 ml

— νερό (2.0): 511 ml

4.6. Παρασκευή των διαλυμάτων έκλουσης HPLC

4.6.1. Διαλύτης έκλουσης A (παράδειγμα)

80 μέρη (κατ' όγκο) νερό (2.0)

20 μέρη (κατ' όγκο) οξικό οξύ (4.3).

Ο διαλύτης έκλουσης απαερώνεται για πέντε λεπτά.

Σημείωση: Εάν το χρησιμοποιούμενο νερό δεν έχει διηθηθεί από μικροηθμό, συνιστάται η διήθηση του παρασκευαζόμενου διαλύτη έκλουσης μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες με μέγεθος πόρων μικρότερο ή ίσο με 0,45 μm.

4.6.2. Διαλύτης έκλουσης B

Μεθανόλη (4.4).

4.7. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Όλα τα πρότυπα διαλύματα πρέπει να απορρίπτονται μετά παρέλευση δύο μηνών από την παρασκευή τους.

4.7.1. Διάλυμα αναφοράς C

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, ζυγίζονται με προσέγγιση 0,1 mg, 25 mg γλυκυρριζινικού αμμωνίου (4.2). Προστίθεται μικρή ποσότητα αιθανόλης 50 % vol. (4.5) προς διάλυση του

▼**M1**

γλυκυρριζινικού αμμωνίου. Αφού αυτό διαλυθεί, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή, με αιθανόλη 50 % vol. (4.5).

Το προκύπτον διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες.

4.7.2. Πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της γραμμικότητας της απόκρισης των οργάνων

Παρασκευάζεται ένα αρχικό διάλυμα συγκεντρώσεως 1,0 g/l, ζυγίζοντας, με προσέγγιση 0,1 mg, 100 mg γλυκυρριζινικού αμμωνίου σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προστίθεται μικρή ποσότητα αιθανόλης 50 % vol. (4.5) προς διάλυση του γλυκυρριζινικού αμμωνίου. Αφού αυτό διαλυθεί, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 50 % vol. (4.5).

Παρασκευάζονται 4 άλλα διαλύματα γλυκυρριζινικού αμμωνίου με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,25 και 0,5 g/l ως εξής: σε τέσσερις ογκομετρικές φιάλες των 100 ml, φέρονται με σιφώνιο αντιστοίχως 5 ml, 10 ml, 25 ml και 50 ml αντιστοίχως από το αρχικό διάλυμα συγκεντρώσεως 1,0 g/l. Στη συνέχεια σε κάθε μία από αυτές συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 50 % vol. (4.5) και το όλον αναμειγνύεται καλώς.

Όλα τα διαλύματα διηθούνται μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες.

5. **Συσκευές και εξοπλισμός**

5.1. Σύστημα διαχωρισμού

5.1.1. Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης

5.1.2. Αντλία με δυνατότητα επίτευξης και διατήρησης σταθερής ή προγραμματισμένης ταχύτητας ροής με μεγάλη ακρίβεια.

5.1.3. Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής UV: ρύθμιση στα 254 nm.

5.1.4. Σύστημα απαέρωσης διαλυτών

5.2. Σύστημα ολοκλήρωσης με υπολογιστή ή καταγραφικό, συμβατό με το υπόλοιπο σύστημα.

5.3. Στήλη (παράδειγμα):

υλικό: ανοξείδωτος χάλυβας ή γυαλί

εσωτερική διάμετρος: 4-5 mm

μήκος: 100-250 mm

στατική φάση: αντίστροφη φάση δεκαοκτυλικών (C18) χαρακτηριστικών ομάδων (κατά προτίμηση σφαιρικών) διασταυρούμενης σύνδεσης επί διοξειδίου του πυριτίου (cross-linked silica with an octadecyl derived functional group), μέγιστο μέγεθος σωματιδίων: 5 μm.

5.4. Εργαστηριακός εξοπλισμός

5.4.1. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0,1 mg.

5.4.2. Ογκομετρικά γυάλινα σκεύη κατηγορίας A

5.4.3. Διάταξη διήθησης με μικρομεβράνες για μικρούς όγκους

6. **Χρωματογραφικές συνθήκες**

6.1. Συνθήκες έκλουσης (παράδειγμα):

— ταχύτητα ροής: 1 ml/minute

— διαλύτης A = 30 %

— διαλύτης B = 70 %

6.2. ανίχνευση:

— UV = 254 nm

7. **Διαδικασία**

7.1. Προετοιμασία του δείγματος του αλκοολούχου ποτού

Το δείγμα διηθείται, αν χρειάζεται, μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες (διάμετρος πόρων: 0,45 μm).

▼**M1**

7.2. Προσδιορισμός

Αφού σταθεροποιηθούν οι χρωματογραφικές συνθήκες:

— Εγχύονται 20 μl του διαλύματος αναφοράς C (4.7.1),

— Εγχύονται 20 μl του διαλύματος του δείγματος,

— τα δύο χρωματογραφήματα συγκρίνονται. Ταυτοποιούνται οι κορυφές του γλυκυρριζικού οξέος από τους χρόνους κατακράτησής τους. Μετρώνται τα εμβαδά (ή ύψη) τους και υπολογίζεται η συγκέντρωση σε g/l με δύο δεκαδικά ψηφία, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

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

όπου:

c είναι η συγκέντρωση του γλυκυρριζικού οξέος σε γραμμάρια ανά λίτρο αλκοολούχου ποτού,

C είναι η συγκέντρωση γλυκυρριζινικού αμμωνίου σε γραμμάρια ανά λίτρο στο διάλυμα αναφοράς,

H είναι το εμβαδόν (ή το ύψος) της κορυφής του γλυκυρριζικού οξέος του διαλύματος αναφοράς,

h είναι το εμβαδόν (ή το ύψος) της κορυφής του γλυκυρριζικού οξέος του αναλυμένου αλκοολούχου ποτού,

P είναι η καθαρότητα του γλυκυρριζινικού αμμωνίου αναφοράς (σε %),

823 είναι το μοριακό βάρος του γλυκυρριζικού οξέος,

840 είναι το μοριακό βάρος του γλυκυρριζινικού αμμωνίου.

8. **Χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου (ακρίβεια)**

Στατιστικά αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής:

Στον πίνακα που ακολουθεί, δίδονται οι τιμές για το γλυκυρριζικό οξύ.

Τα δεδομένα που ακολουθούν ελήφθησαν από διεθνή μελέτη για την απόδοση της μεθόδου, που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες.

Έτος διεργαστηριακών δοκιμών	1998
Αριθμός εργαστηρίων	16
Αριθμός δειγμάτων	5
Αναλύτης	γλυκυρριζικό οξύ

Δείγματα	A	B	C	D	E
Αριθμός εργαστηρίων μετά την αφαίρεση των αποκλινουσών τιμών	13	14	15	16	16
Αριθμός αποκλινουσών τιμών (εργαστήρια)	3	2	1	—	—
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	26	28	30	32	32
Μέση τιμή g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Όριο επαναληψιμότητας (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013

▼**M1**

Δείγματα	A	B	C	D	E
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Τύποι δειγμάτων:

A pastis, τυφλά εις διπλούν

B pastis, επίπεδα split (*)

C pastis, τυφλά εις διπλούν

D pastis, τυφλά εις διπλούν

E pastis, τυφλά εις διπλούν

▼M1

VII. ΧΑΛΚΟΝΕΣ. ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ ΣΕ PASTIS

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος είναι κατάλληλη για την εξακρίβωση της παρουσίας ή μη χαλκονών σε ποτά αρωματισμένα με άνισο. Οι χαλκόνες είναι φυσικές χρωστικές ύλες της οικογένειας των φλαβονοειδών, που απαντώνται στη γλυκόριζα (Glycyrrhiza glabra).

Για να μπορεί ένα αρωματισμένο με άνισο αλκοολούχο ποτό να ονομάζεται «pastis», πρέπει να περιέχει χαλκόνες. [κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89].

2. **Σχετικά πρότυπα**

ISO 3696: 1987, Νερό αναλυτικής καθαρότητας — Προδιαγραφές και μέθοδοι ανάλυσης

3. **Αρχή**

Παρασκευάζεται διάλυμα αναφοράς εκχυλίσματος γλυκόριζας. Η παρουσία ή μη χαλκονών εξακριβώνεται χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή UV.

4. **Αντιδραστήρια και υλικά**

Κατά την ανάλυση, χρησιμοποιούνται μόνον αντιδραστήρια καθαρότητας κατάλληλης για HPLC. Η αιθανόλη θα πρέπει να είναι 96 % vol., ενώ πρέπει να χρησιμοποιείται μόνον νερό καθαρότητας 3 όπως ορίζεται στο ISO 3696.

4.1. Αιθανόλη 96 % vol. (CAS 64-17-5)

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

4.3. Ουσία αναφοράς: Glycyrrhiza glabra (γλυκόρριζα)

Χονδροαλεσμένες γλυκόρριζες (Glycyrrhiza glabra). Μέσες διαστάσεις των ραβδόμορφων σωματιδίων: μήκος: 10-15 mm πάχος: 1-3 mm.

4.4. Οξικό νάτριο, CH_3COONa (CAS 127-09-3)

4.5. Παγόμορφο οξικό οξύ, CH_3COOH (CAS 64-19-7)

4.6. Παρασκευή διαλυμάτων

4.6.1. Αιθανόλη 50 % κ.ο.

Για 1 000 ml στους 20 ºC:

— αιθανόλη 96 % vol. (4.1): 521 ml

— νερό (2.0): 511 ml

4.6.2. Διαλύτης Α: ακετονιτρίλιο

Ακετονιτρίλιο (4.2) αναλυτικής καθαρότητας για HPLC.

Απαέρωση

4.6.3. Διαλύτης Β: ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,1 m, pH 4.66

Σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml ζυγίζονται 8,203 g οξικού νατρίου (4.4), ακολούθως προστίθενται 6,005 g παγόμορφου οξικού οξέος (4.5) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 1 000 ml με νερό (2).

5. **Παρασκευή του εκχυλίσματος αναφοράς από Glycyrrhiza glabra (4.3)**

5.1. Ζυγίζονται 10 g χονδροαλεσμένης γλυκόριζας (Glycyrrhiza glabra) (4.3) και φέρονται σε φιάλη αποστάξεως με σφαιρικό πυθμένα.

— Προστίθενται 100 ml αιθανόλης 50 % vol. (4.6.1).

— Υποβάλλεται σε βρασμό υπό επαναρροή (με κάθετο ψυκτήρα) επί μία ώρα.

— Διηθείται.

▼M1

— Το διήθημα φυλάσσεται για να χρησιμοποιηθεί αργότερα.

5.2. Παραλαμβάνεται από τον ηθμό το εκχύλισμα της γλυκόρριζας

— Φέρεται σε φιάλη αποστάξεως με σφαιρικό πυθμένα.
— Προστίθενται 100 ml αιθανόλης 50 % vol. (4.6.1.).
— Υποβάλλεται σε βρασμό υπό επαναρροή (με κάθετο ψυκτήρα) επί μία ώρα.
— Διηθείται. Το διήθημα φυλάσσεται για αργότερα.

5.3. Η εκχύλιση της γλυκόριζας πρέπει να εκτελείται τρεις φορές διαδοχικά.

5.4. Τα τρία διηθήματα (εκχυλίσματα) αναμειγνύονται.

5.5. Ο διαλύτης απομακρύνεται (από το 5.4) με εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα.

5.6. Το μετά την απομάκρυνση του διαλύτη υπόλειμμα του εκχυλίσματος (5.5) παραλαμβάνεται με 100 ml αιθανόλη 50 % vol. (4.6.1).

6. **Συσκευές και εξοπλισμός**

6.1. Σύστημα διαχωρισμού

6.1.1. Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

6.1.2. Αντλία με δυνατότητα επίτευξης και διατήρησης σταθερής ή προγραμματισμένης ταχύτητας ροής σε υψηλή πίεση.

6.1.3. Σύστημα ανίχνευσης δια φασματοφωτομετρίας UV/ορατού, το οποίο μπορεί να ρυθμίζεται στα 254 και 370 nm.

6.1.4. Σύστημα απαέρωσης διαλυτών

6.1.5. Φούρνος στήλης, που να μπορεί να ρυθμίζεται σε θερμοκρασία 40 ± 0,1 ºC.

6.2. Σύστημα ολοκλήρωσης με υπολογιστή ή καταγραφικό, συμβατό με το υπόλοιπο σύστημα.

6.3. Στήλη

Υλικό: ανοξείδωτος χάλυβας ή γυαλί

Εσωτερική διάμετρος: 4-5 mm

Στατική φάση: αντίστροφη φάση δεκαοκτυλικών χαρακτηριστικών ομάδων (C18) διασταυρούμενης σύνδεσης επί διοξειδίου του πυριτίου (cross-linked silica with an octadecyl derived functional group), μέγεθος σωματιδίων: 5 μm κατά μέγιστο (cross-linked phase).

6.4. Κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός, στον οποίο περιλαμβάνονται:

6.4.1. Αναλυτικός ζυγός (ακρίβεια: ± 0,1 mg).

6.4.2. Συσκευή αποστάξεως με κάθετο ψυκτήρα, αποτελούμενη από π.χ.:

— φιάλη των 250 ml με σφαιρικό πυθμένα και τυποποιημένο εσμυρισμένο στόμιο σύνδεσης,
— κάθετο ψυκτήρα μήκους 30 cm
— πηγή θερμότητας (με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης, πρέπει να αποφεύγεται η οποιαδήποτε πυρόλυση του εκχυλίσματος).

6.4.3. Περιστροφική συσκευή εξάτμισης

6.4.4. Σύστημα διήθησης (δηλαδή χωνί Buchner)

6.5. Χρωματογραφικές συνθήκες (παράδειγμα)

6.5.1. Χαρακτηριστικά έκλουσης διαλυτών A (4.6.2) και B (4.6.3):

— διαβάθμιση από 20/80 (v/v) σε 50/50 (v/v) σε δεκαπέντε λεπτά
— διαβάθμιση από 50/50 (v/v) σε 75/25 (v/v) σε πέντε λεπτά
— ισοκρατικό στα 75/25 (v/v) για πέντε λεπτά
— σταθεροποίηση της στήλης μεταξύ εγχύσεων:
— ισοκρατικό στα 20/80 (v/v) για πέντε λεπτά.

6.5.2. Ταχύτητα ροής: 1 ml/λεπτό

▼**M1**

6.5.3. Ρυθμίσεις ανιχνευτή UV:

Ο ανιχνευτής πρέπει να ρυθμίζεται στα 370 nm για την ανίχνευση της παρουσίας χαλκονών και κατόπιν στα 254 nm για την ανίχνευση του γλυκυρριζικού οξέος.

Σημείωση: Η αλλαγή του μήκους κύματος (από 370 nm σε 254 nm) πρέπει να γίνεται 30 δευτερόλεπτα πριν από την έναρξη εμφάνισης της κορυφής του εκλουόμενου γλυκυρριζικού οξέος.

7. **Διαδικασία**

7.1. Προετοιμασίας του δείγματος του αλκοολούχου ποτού

Το δείγμα διηθείται μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες (διάμετρος πόρων: 0,45 μm).

7.2. Προετοιμασία του συμπυκνωθέντος εκχυλίσματος γλυκόρριζας (5.6)

Πριν από την ανάλυση, γίνεται αραίωση 1 προς 10 με αιθανόλη 50 % vol. (4.6.1)

7.3. Προσδιορισμός

7.3.1. Εγχύονται 20 μl του παρασκευασθέντος εκχυλίσματος γλυκόρριζας (7.2). Εκτελείται η ανάλυση υπό τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω (6.5).

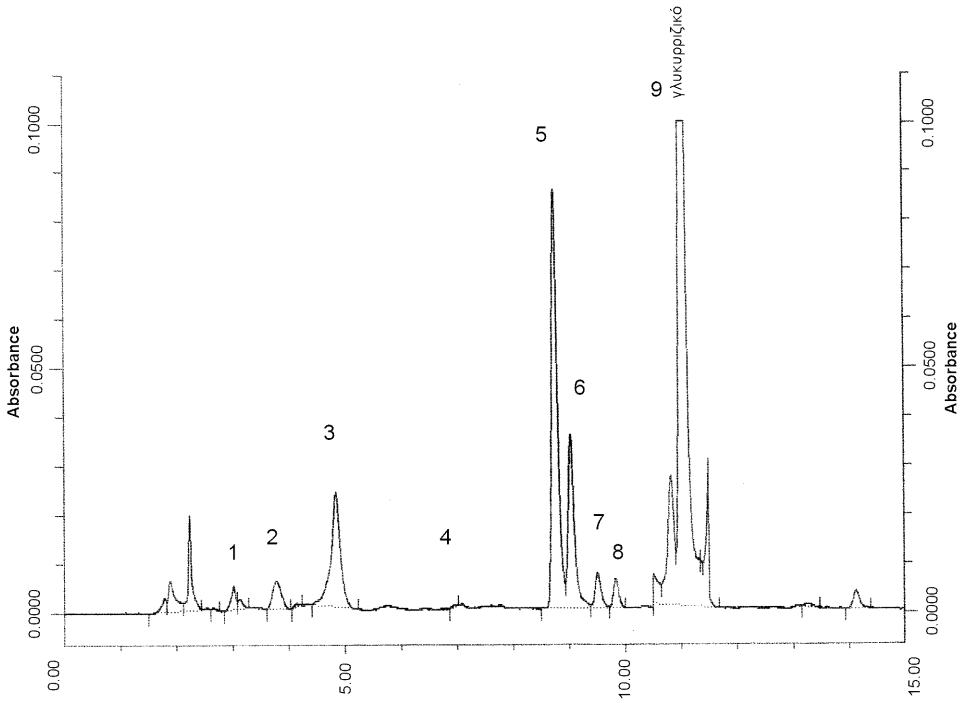
7.3.2. Εγχύονται 20 μl του δείγματος (7.1). (Δείγμα αλκοολούχου ποτού αρωματισμένου με άνισο). Εκτελείται η ανάλυση υπό τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω (6.5).

7.3.3. Τα δύο χρωματογραφήματα συγκρίνονται. Πρέπει να υπάρχει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δύο χρωματογραφημάτων στη ζώνη εξόδου των χαλκονών (κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης στα 370 nm υπό τις περιγραφείσες ανωτέρω συνθήκες αναλύσεως) (βλέπε εικόνα 1).

8. **Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα για pastis**

Εικόνα 1

Χρωματογράφημα ληφθέν με τη μέθοδο που περιγράφεται ανωτέρω και το οποίο δείχνει την παρουσία χαλκονών σε «pastis». Οι κορυφές 1-8 είναι χαλκόνες και η κορυφή 9 γλυκυρριζικό οξύ.



▼M1

9. **Χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου (ακρίβεια)**

Αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής:

Στον πίνακα που ακολουθεί εμφαίνεται η απόδοση στην αναγνώριση της παρουσίας ή μη χαλκονών σε pastis και σε αρωματισμένα με άνισο αλκοολούχα ποτά.

Τα δεδομένα που ακολουθούν ελήφθησαν από διεθνή μελέτη για την απόδοση της μεθόδου, που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες.

Έτος διεργαστηριακής δοκιμής	1998
Αριθμός εργαστηρίων	14
Αριθμός δειγμάτων	11
Αναλύτης	χαλκόνες

Δείγματα	A	B	C	D	E	F
Αριθμός εργαστηρίων μετά την αφαίρεση των αποκλινουσών τιμών	14	14	14	14	14	13
Αριθμός αποκλινουσών τιμών (εργαστήρια)	—	—	—	—	—	1 (*)
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	28	14	14	28	28	26
Αριθμός αποτελεσμάτων για ύπαρξη χαλκονών	28	14	14	0	28	0
Αριθμός αποτελεσμάτων για απουσία χαλκονών	0	0	0	28	0	26
Ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Ασύμβατα αποτελέσματα μεταξύ των εις διπλούν δειγμάτων, αποδιδόμενα σε δειγματοληπτικό σφάλμα.

Δείγματα	G	H	I	J	K
Αριθμός εργαστηρίων μετά την αφαίρεση των αποκλινουσών τιμών	14	14	14	14	14
Αριθμός αποκλινουσών τιμών (εργαστήρια)	—	—	—	—	—
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	28	14	14	28	28
Αριθμός αποτελεσμάτων για ύπαρξη χαλκονών	0	0	0	0	0
Αριθμός αποτελεσμάτων για απουσία χαλκονών	28	14	14	28	28
Ποσοστό ορθών αποτελεσμάτων (%)	100	100	100	100	100

Τύποι δειγμάτων:

A pastis, τυφλά εις διπλούν

B pastis, δείγμα εις απλούν

C pastis, δείγμα εις απλούν

D «pastis» (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν

E «pastis» (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν

F λικέρ αρωματισμένο με άνισο (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν

▼**M1**

G λικέρ αρωματισμένο με άνισο (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν

H ούζο (μη περιέχον χαλκόνες), δείγμα εις απλούν

I ούζο (μη περιέχον χαλκόνες), δείγμα εις απλούν

J anis (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν

K «pastis» (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν

▼M1

IX. ΚΡΟΚΟΣ ΑΥΓΟΥ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΡΟΚΟΥ ΑΥΓΟΥ ΣΕ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ — ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κρόκου αυγού της τάξης των 40-250 g/l στα λικέρ με βάση αυγά και στα λικέρ με αυγά.

2. **Σχετικά πρότυπα**

ISO 3696:1897 Νερό αναλυτικής καθαρότητας — Προδιαγραφές και μέθοδοι ανάλυσης.

3. **Αρχή**

Οι διαλυτές σε αιθανόλη ενώσεις του φωσφόρου που βρίσκονται στον κρόκο του αυγού εκχυλίζονται και προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά ως φωσφορομολυβδαινικό σύμπλοκο.

4. **Αντιδραστήρια και υλικά**

4.1. Δισαπεσταγμένο νερό

4.2. Γη διατόμων

4.3. Αιθανόλη 96 % vol. (CAS 64-17-5)

4.4. Διάλυμα οξικού μαγνησίου 15 % (CAS 16674-78-5)

4.5. Διάλυμα θειικού οξέος 10 % (CAS 7664-93-9)

4.6. Διάλυμα θειικού οξέος 1 N

4.7. Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου KH_2PO_4 (CAS 778-77-0) 0,16 g/l

4.8. Αντιδραστήριο για τον προσδιορισμό των φωσφορικών:

20 g μολυβδαινικού αμμωνίου (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ διαλύονται σε 400 ml νερό στους 50 ºC.

Σε άλλο δοχείο, διαλύεται 1 g βαναδικού αμμωνίου (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3, σε 300 ml ζεστό νερό, αφήνεται να ψυχθεί και κατόπιν προστίθενται 140 ml πυκνού νιτρικού οξέος (CAS 7697-37-2). Τα διαλύματα, αφού ψυχθούν, αναμειγνύονται σε ογκομετρική φιάλη 1 000 ml και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή των 1 000 ml.

5. **Συσκευές και εξοπλισμός**

5.1. Κωνική φιάλη 100 ml

5.2. Λουτρό υπερήχων (ή μαγνητικός αναδευτήρας)

5.3. Ογκομετρική φιάλη 100 ml

5.4. Υδρόλουτρο 20 ºC

5.5. Ηθμός (Whatman 4 ή ισοδύναμο)

5.6. Χωνευτήριο πορσελάνης (ή πλατίνας)

5.7. Λουτρό ζέοντος ύδατος

5.8. Θερμαντική πλάκα

5.9. Κλίβανος αποτέφρωσης

5.10. Ογκομετρική φιάλη 50 ml

5.11. Ογκομετρική φιάλη 20 ml

5.12. Φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο στα 420 nm

5.13. Κυψελίδα 1 cm.

6. **Δείγματα**

Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να αναλυθούν.

▼M1

7. **Διαδικασία**

7.1. Ετοιμασία του δείγματος

7.1.1. Ζυγίζονται 10 g δείγματος σε κωνική φιάλη 100 ml (5.1).

7.1.2. Προστίθενται βαθμιαία, σε μικρές ποσότητες, 70 ml απόλυτης αιθανόλης (4.3), αναδεύοντας μετά από κάθε προσθήκη, και φέρουμε σε λουτρό υπερήχων (5.2) για 15 λεπτά [ή αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα (5.2) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου].

7.1.3. Το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται ποσοτικά με απόλυτη αιθανόλη (4.3) σε ογκομετρική φιάλη 100 ml (5.3). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με απόλυτη αιθανόλη (4.3) και η φιάλη τοποθετείται σε υδρόλουτρο 20 ºC (5.4). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή στους 20 ºC.

7.1.4. Προστίθεται μικρή ποσότητα γης διατόμων (4.2) και το μείγμα διηθείται (5.5), απορριπτομένων των πρώτων 20 ml.

7.1.5. 25 ml του διηθήματος μεταφέρονται σε χωνευτήριο πορσελάνης (ή πλατίνας) (5.6). Το διήθημα συμπυκνώνεται με ήπια εξάτμιση σε λουτρό ζέοντος ύδατος (5.7), μετά από την προσθήκη 5 ml διαλύματος οξικού μαγνησίου 15 % (4.4).

7.1.6. Το χωνευτήριο τοποθετείται σε θερμαντική πλάκα (5.8) και θερμαίνεται σχεδόν μέχρι ξηρού.

7.1.7. Το υπόλειμμα αποτεφρώνεται με πύρωση στους 600 ºC σε κλίβανο αποτέφρωσης (5.9), μέχρις ότου η τέφρα γίνει λευκή. Χρειάζεται τουλάχιστον μιάμιση ώρα, μπορεί όμως να αφεθεί και όλη τη νύχτα.

7.1.8. Η τέφρα παραλαμβάνεται με 10 ml θειικού οξέος 10 % (4.5) και μεταφέρεται ποσοτικά δι' εκπλύσεως με απεσταγμένο νερό (4.1) σε ογκομετρική φιάλη 50 ml (5.10), Στη συνέχεια η φιάλη πληρούται, σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό (4.1). Από το προκύπτον αυτό διάλυμα της τέφρας λαμβάνεται ποσότητα 5 ml για την παρασκευή του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί ως δείγμα για τη φασματοφωτομετρική εξέταση των φωσφορικών.

7.2. Φασματοφωτομετρική εξέταση των φωσφορικών

7.2.1. Διάλυμα σύγκρισης

7.2.1.1. 10 ml διαλύματος θειικού οξέος 10 % (4.5) φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (5.10) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό (4.1).

7.2.1.2. 5 ml από το παραπάνω διάλυμα (7.2.1.1) φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml (5.11) προστίθενται 1 ml θειικού οξέος 1 N (4.6) και 2 ml του αντιδραστηρίου φωσφορικών (4.8) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό (4.1).

7.2.1.3. Η φιάλη πωματίζεται χαλαρά, ανακινείται και θερμαίνεται λουτρό ζέοντος ύδατος (5.7) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ψύχεται σε υδρόλουτρο 20 ºC (5.4) για 20 λεπτά.

7.2.1.4. Μια κυψελίδα του 1 cm (5.13) πληρούται με αυτό το διάλυμα σύγκρισης.

7.2.2. Διάλυμα δείγματος

7.2.2.1. 5 ml από το διάλυμα της τέφρας (7.1.8) φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml (5.11), προστίθεται 1 ml θειικού οξέος 1 N (4.6) και 2 ml του αντιδραστηρίου φωσφορικών (4.8) και συμπληρώνεται ο όγκος, μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό (4.1).

7.2.2.2. Η φιάλη πωματίζεται χαλαρά ανακινείται και θερμαίνεται σε λουτρό ζέοντος ύδατος (5.7) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ψύχεται σε υδρόλουτρο 20 ºC (5.4) για 20 λεπτά.

7.2.2.3. Το προκύπτον, κιτρίνου χρώματος διάλυμα φέρεται σε κυψελίδα του 1 cm (5.13) και εξετάζεται αμέσως φασματοφωτομετρικά (5.12) στα 420 nm ως προς το διάλυμα σύγκρισης (7.2.1.4).

▼M1

7.2.3. Καμπύλη αναφοράς.

7.2.3.1. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, σε κάθε μία από τις έξι ογκομετρικές φιάλες των 20 ml μεταφέρεται 1 ml θειικού οξέος 1 N (4.6), κατόπιν προστίθενται 2 ml του φωσφορικού αντιδραστηρίου (4.8) και αντιστοίχως 0, 2, 4, 6, 8 και 10 ml από το διάλυμα του δισόξινου φωσφορικού καλίου (4.7) και ο όγκος συμπληρώνεται, μέχρι τη χαραγή, με απεσταγμένο νερό (4.1).

7.2.3.2. Η κάθε μια από τις παραπάνω φιάλες πωματίζεται χαλαρά, ανακινείται και θερμαίνεται σε λουτρό ζέοντος ύδατος (5.7) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ψύχεται σε υδρόλουτρο 20 ºC (5.4) για 20 λεπτά και το περιεχόμενο σ' αυτή διάλυμα φέρεται σε κυψελίδα του 1 cm (5.13) και εξετάζεται φασματοφωτομετρικά (5.12) στα 420 nm ως προς το διάλυμα σύγκρισης (7.2.1.4).

7.2.3.3. Κατασκευή της καμπύλης αναφοράς:

Δισόξινο φωσφορικό διάλυμα (ml)	0	2	4	6	8	10
P_2O_5 (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. **Έκφραση των αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα σε κρόκο αυγού υπολογίζεται σε g/l από τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{g/l κρόκου αυγού} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{πυκνότητα}}{E/40}$$

όπου:

110	συντελεστής μετατροπής για το συνολικό P_2O_5 σε g σε 100 g κρόκου αυγού,
mg P_2O_5	η τιμή η προσδιοριζόμενη από την καμπύλη αναφοράς,
πυκνότητα	η μάζα ανά μονάδα όγκου (g/ml) του με βάση τα αυγά λικέρ στους 20 ºC,
E	το βάρος του με βάση τα αυγά λικέρ σε g,
40	ο συντελεστής αραίωσης για ποσότητα 5 ml διαλύματος τέφρας.

9. **Χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου (πιστότης)**

Στατιστικά αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής:

Στον πίνακα που ακολουθεί δίδονται οι τιμές για τον κρόκο αυγού.

Τα δεδομένα που ακολουθούν ελήφθησαν από διεθνή μελέτη για την απόδοση της μεθόδου, που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένες διαδικασίες.

Έτος διεργαστηριακής δοκιμής	1998
Αριθμός εργαστηρίων	24
Αριθμός δειγμάτων	5
Αναλύτης	Κρόκος αυγού

Δείγματα	A	B	C	D	E
Αριθμός εργαστηρίων μετά την αφαίρεση των αποκλινουσών τιμών	19	20	22	20	22
Αριθμός αποκλινουσών τιμών (εργαστήρια)	3	4	2	4	2
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	38	40	44	40	44

▼**M1**

Δείγματα	A	B	C	D	E
Μέση τιμή	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Όριο επαναληψιμότητας (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Τύποι δειγμάτων:

A Advocaat, τυφλά εις διπλούν

B Advocaat, τυφλά εις διπλούν

C Advocaat, τυφλά εις διπλούν

D Advocaat (αραιωμένο), επίπεδα split (*)

E Advocaat, τυφλά εις διπλούν.