Este documento es un instrumento de documentación y no compromete la responsabilidad de las instituciones

►**B** **REGLAMENTO (CE) Nº 2870/2000 DE LA COMISIÓN**

de 19 de diciembre de 2000

que establece métodos comunitarios de referencia para el análisis de las bebidas espirituosas

(DO L 333 de 29.12.2000, p. 20)

Modificado por:

		Diario Oficial		
		nº	página	fecha
►**M1**	Reglamento (CE) nº 2091/2002 de la Comisión de 26 de noviembre de 2002	L 322	11	27.11.2002

▼B

REGLAMENTO (CE) Nº 2870/2000 DE LA COMISIÓN

de 19 de diciembre de 2000

que establece métodos comunitarios de referencia para el análisis de las bebidas espirituosas

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CEE) nº 1576/89 del Consejo, de 29 de mayo de 1989, por el que se establecen las normas generales relativas a la definición, designación y presentación de las bebidas espirituosas ([1]), cuya última modificación la constituye el Acta de adhesión de Austria, de Finlandia y de Suecia, y, en particular, el apartado 8 de su artículo 4,

Considerando lo siguiente:

(1) El apartado 8 del artículo 4 del Reglamento (CEE) nº 1576/89 dispone la aprobación de métodos de análisis de las bebidas espirituosas. Cuando se efectúe cualquier tipo de control oficial o en caso de litigio, es preciso utilizar métodos de referencia que garanticen el cumplimiento del Reglamento (CEE) nº 1576/89 y del Reglamento (CEE) nº 1014/90 de la Comisión, de 24 de abril de 1990, por el que se establecen las disposiciones de aplicación para la definición, designación y presentación de las bebidas espirituosas ([2]), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 2140/98 ([3]).

(2) En la medida de lo posible, como métodos comunitarios de referencia para el análisis convendría adoptar y definir métodos que gocen de reconocimiento general.

(3) Para tener en cuenta los progresos científicos y las diferencias de equipamiento de los laboratorios oficiales, es conveniente permitir, bajo la responsabilidad del jefe de laboratorio correspondiente, la aplicación de métodos basados en otros principios de medición que los métodos de referencia descritos en el anexo del presente Reglamento, cuando esos métodos ofrezcan suficientes garantías de resultados y respondan a los criterios establecidos en el anexo de la Directiva 85/591/CEE del Consejo, de 20 de diciembre de 1985, referente a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control de los productos destinados a la alimentación humana ([4]), y pueda demostrarse que la exactitud, la repetibilidad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos con estos métodos oscilan dentro de los límites de los resultados obtenidos mediante los métodos de referencia descritos en el presente Reglamento. Cuando se cumpla esta condición, cabe permitir la aplicación de otros métodos de análisis. No obstante, es necesario precisar que en caso de litigio estos otros métodos no pueden sustituir a los de referencia.

(4) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de aplicación de bebidas espirituosas.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

En el anexo del presente Reglamento figuran los métodos comunitarios de referencia aplicables al análisis de las bebidas espirituosas para garantizar el cumplimiento de lo dispuesto en los Reglamentos (CEE) nº 1576/89 y (CEE) nº 1014/90:

— con ocasión de todo tipo de controles oficiales, o

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

▼B

— en caso de cualquier litigio.

Artículo 2

No obstante lo dispuesto en el primer guión del artículo 1, se admitirá la aplicación de otros métodos de análisis, bajo la responsabilidad del director de laboratorio, a condición de que la exactitud y la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) de estos métodos sean por lo menos equivalentes a las de los métodos de análisis de referencia correspondientes, que figuran en el anexo.

Artículo 3

Cuando no haya establecidos métodos de análisis comunitarios de referencia para la detección y cuantificación de sustancias contenidas en una bebida espirituosa determinada, serán aplicables:

a) métodos de análisis validados con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos que se ajusten concretamente a los criterios establecidos en el anexo de la Directiva 85/591/CEE;

b) métodos de análisis conformes a las normas recomendadas por la Organización Internacional de Normalización (ISO);

c) métodos de análisis reconocidos por la asamblea general de la Oficina Internacional de la Viña y el Vino (OIV) y publicados por esa Oficina; o

d) a falta de un método de los indicados en las letras a), b) y c), y en razón de su exactitud, repetibilidad y reproducibilidad:

   — un método de análisis admitido por el Estado miembro interesado, o

   — en caso necesario, cualquier otro método de análisis adecuado.

Artículo 4

A efectos del presente Reglamento, se entenderá por:

a) «límite de repetibilidad»: el valor en el cual o por debajo del cual cabe encontrar, con una probabilidad del 95 %, la diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad (mismo operario, mismo aparato, mismo laboratorio y un breve intervalo de tiempo) (ISO 3534-1);

b) «límite de reproducibilidad»: el valor en el cual o por debajo del cual cabe encontrar, con una probabilidad del 95 %, la diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad (diferentes operarios, diferentes aparatos y diferentes laboratorios) (ISO 3534-1);

c) «exactitud»: el grado de coincidencia entre el resultado anunciado y el valor de referencia reconocido (ISO 3534-1).

Artículo 5

El presente Reglamento entrará en vigor el séptimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Será aplicable a partir del 1 de enero de 2001.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

▼B

ANEXO

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE REFERENCIA

I. Determinación del grado alcohólico volumétrico

Apéndice I. Preparación del destilado

Apéndice II. Medida de la densidad absoluta del destilado

— Método A: picnometría

— Método B: densimetría electrónica

— Método C: densimetría

II. Determinación del extracto seco total (por gravimetría)

III. Determinación de las sustancias volátiles y del metanol

III.1 Observaciones generales

III.2 Congéneres volátiles: aldehídos, alcoholes superiores, acetato de etilo y metanol (cromatografía de gases)

III.3 Acidez volátil (p.m.)

IV. Ácido cianhídrico (p.m.)

V. Anetol ►M1 ——— ◄

VI. Ácido glicirrícico ►M1 ——— ◄

VII. Chalconas ►M1 ——— ◄

VIII. Azúcares totales (p.m.)

IX. Yema de huevo ►M1 ——— ◄

▼B

I. DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO VOLUMÉTRICO DE LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS

Introducción

El método de referencia incluye dos apéndices:

Apéndice I. Preparación del destilado

Apéndice II. Medida de la densidad absoluta del destilado

1. **Ámbito de aplicación**

El método es adecuado para la determinación del grado alcohólico volumétrico real de las bebidas espirituosas.

2. **Referencias normativas**

ISO 3696:1987: Agua para fines analíticos — Especificaciones y métodos de ensayo.

3. **Términos y definiciones**

3.1. *Temperatura de referencia*

La temperatura de referencia para la determinación del grado alcohólico volumétrico, densidad absoluta y densidad relativa de las bebidas espirituosas queda fijada en 20 ºC.

Nota 1: La expresión «a t ºC» queda reservada para todas las determinaciones (de densidad absoluta o grado alcohólico volumétrico) realizadas a una temperatura distinta a la de referencia (20 ºC).

3.2. *Densidad absoluta*

La densidad absoluta (o masa volúmica) es la masa por unidad de volumen en vacío de una bebida espirituosa a 20 ºC. Se expresa en kilogramos por metro cúbico y su símbolo es ρ_{20} o ρ_{20}.

3.3. *Densidad relativa*

La densidad relativa es la relación, expresada como número decimal, entre la densidad absoluta de la bebida espirituosa a 20 ºC y la densidad absoluta del agua a la misma temperatura. Su símbolo es $d_{20\,°C/20\,°C}$ o $d_{20/20}$, o simplemente d cuando no haya confusión posible. En los certificados de análisis, la característica estudiada deberá especificarse exclusivamente mediante los símbolos definidos anteriormente.

Nota 2: Es posible obtener la densidad relativa a partir de la densidad absoluta ρ_{20} a 20 ºC:

ρ_{20} = 998,203 x $d_{20/20}$ o $d_{20/20}$ = ρ_{20}/998,203, donde 998,203 es la densidad absoluta del agua a 20 ºC.

3.4. *Grado alcohólico volumétrico real*

El grado alcohólico volumétrico real de las bebidas espirituosas es igual al número de litros de alcohol etílico contenidos en un hectolitro de una mezcla hidroalcohólica que tenga la misma densidad absoluta que el alcohol o la bebida espirituosa después de destilados. Los valores de referencia del grado alcohólico volumétrico (% vol) a 20 ºC en función de la densidad absoluta a 20 ºC de las mezclas hidroalcohólicas que deben utilizarse son los que figuran en la tabla internacional adoptada por la Organización Internacional de Metrología Legal en su recomendación nº 22.

La ecuación general que relaciona el grado alcohólico volumétrico y la densidad absoluta de las mezclas hidroalcohólicas a una temperatura determinada es la que figura en la página 40 del capítulo 3, «Grado alcohólico volumétrico» del anexo del Reglamento (CEE) nº 2676/90 de la Comisión (DO L 272 de 3.10.1990, p. 1) o en el Manual de métodos de análisis de la OIV (1994), (p. 17).

Nota 3: En el caso de los licores y cremas cuyo volumen resulte muy difícil medir con exactitud, la muestra deberá ser pesada, y se calculará previamente el grado alcohólico másico.

▼B

Fórmula de conversión:

$$\text{grado alcohólico volumétrico (\% vol)} = \frac{\text{GAM (\% masa)} \times \rho_{20}\ \text{(muestra)}}{\rho_{20}\ \text{(alcohol)}}$$

donde GAM = grado alcohólico másico,

ρ_{20} (alcohol) = 789,24 kg/m^3

4. **Principio**

Tras la destilación, el grado alcohólico volumétrico del destilado se determina por picnometría, densimetría electrónica o densimetría por balanza hidrostática.

▼B

APÉNDICE I. PREPARACIÓN DEL DESTILADO

1. **Ámbito de aplicación**

El método es adecuado para la preparación de destilados con objeto de determinar el grado alcohólico volumétrico real de las bebidas espirituosas.

2. **Principio**

Las bebidas espirituosas se destilan con la finalidad de separar el extracto (sustancias que no pueden destilarse) del alcohol etílico y otros compuestos volátiles.

3. **Reactivos y materiales**

3.1. Gránulos reguladores de la ebullición.

3.2. Agente antiespumante en forma concentrada (para los licores de tipo crema).

4. **Aparatos y equipo**

Aparatos de laboratorio habituales y, en particular, los siguientes:

4.1. Baño de agua que pueda mantenerse a una temperatura de 10 a 15 ºC.

Baño de agua que pueda mantenerse a una temperatura de 20 ºC (± 0,2 ºC).

4.2. Matraces aforados de clase A, de 100 y 200 ml de capacidad, verificada con una precisión de ± 0,1 y 0,15 %, respectivamente.

4.3. Aparato de destilación:

4.3.1. Requisitos generales

El aparato de destilación utilizado debe presentar las características siguientes:

— un número de conexiones limitado al estrictamente necesario de forma que se garantice la estanqueidad del sistema,

— un dispositivo que impida el arrastre por el vapor del líquido en ebullición y regule el flujo de destilación de los vapores con alto grado alcohólico,

— condensación rápida y total de los vapores alcohólicos,

— recepción de las primeras fracciones de destilación en medio acuoso.

La fuente de calor debe utilizarse con un difusor adecuado para impedir que el calor altere el extracto.

4.3.2. El aparato de destilación descrito a modo de ejemplo (figura 1) se compone de los elementos siguientes:

— matraz de fondo redondo de un litro, con esmerilado normalizado,

— columna rectificadora de 20 cm de altura como mínimo (del tipo de Vigreux, por ejemplo),

— tubo de conexión acodado provisto en su parte recta de un condensador de bordes rectos de unos 10 cm de largo (de tipo West),

— refrigerante de serpentín de 40 cm de largo,

— tubo alargado que permita conducir el destilado hasta el fondo del matraz aforado receptor, que contendrá una pequeña cantidad de agua.

Nota: El aparato descrito más arriba está previsto para una muestra de al menos 200 ml. No obstante, es posible destilar una muestra más pequeña (100 ml) utilizando un matraz menor, siempre que se emplee un dispositivo antisalpicaduras u otro sistema que impida el efecto de arrastre.

5. **Conservación de las muestras para el ensayo**

Antes de los análisis, las muestras deben estar almacenadas a temperatura ambiente.

▼B

6. **Procedimiento**

Observación preliminar:

También podrá emplearse el procedimiento de destilación publicado por la UIQPA (1968).

6.1. Comprobación del aparato de destilación

El aparato empleado deberá reunir las condiciones siguientes:

La destilación de 200 ml de una solución hidroalcohólica con una concentración conocida cercana al 50 % vol no deberá producir una pérdida de alcohol superior al 0,1 % vol.

6.2. Bebidas espirituosas con un grado alcohólico inferior al 50 % vol.

Poner 200 ml de la bebida espirituosa en un matraz aforado.

Anotar la temperatura de este líquido o mantenerlo a la temperatura de referencia (20 ºC).

Introducir la muestra en el matraz de fondo redondo del aparato de destilación y aclarar tres veces el matraz aforado con aproximadamente 20 ml de agua destilada cada vez. Añadir los líquidos de lavado al contenido del matraz de destilación.

Nota: Esta dilución con 60 ml es suficiente en el caso de las bebidas espirituosas que contengan menos de 250 g de extracto seco por litro. En caso contrario, para evitar las pirólisis, es preciso que el volumen de los líquidos de lavado sea como mínimo de 70 ml si el extracto seco es de 300 g/l, de 85 ml si el extracto seco es de 400 g/l y de 100 ml si el extracto seco es de 500 g/l (algunos licores o cremas de frutas). Ajustar estos volúmenes de forma proporcional en caso de que sean diferentes los volúmenes de las muestras.

Añadir algunos gránulos reguladores de la ebullición (3.1) (y un antiespumante para los licores de tipo crema).

Poner 20 ml de agua destilada en el matraz aforado original de 200 ml que se utilizará para recoger el destilado. A continuación, colocar el matraz en un baño de agua fría (4.1) (entre 10 ºC y 15 ºC en el caso de las bebidas espirituosas anisadas).

Destilar, evitando el efecto de arrastre y la carbonización, agitando de vez en cuando el contenido del matraz, hasta que el nivel del destilado se sitúe a unos pocos milímetros por debajo del enrase del matraz aforado.

Dejar el destilado hasta que alcance una temperatura igual a la del líquido inicial, con una aproximación de ± 0,5 ºC, enrasar a continuación con agua destilada y mezclar cuidadosamente.

Este destilado se utiliza para determinar el grado alcohólico volumétrico (apéndice II).

6.3. Bebidas espirituosas con un grado alcohólico superior al 50 % vol.

Medir 100 ml de la bebida espirituosa con un matraz aforado de 100 ml e introducirlos en el matraz de fondo redondo del aparato de destilación.

Aclarar el matraz aforado varias veces con agua destilada y añadir los líquidos de lavado al contenido del matraz de fondo redondo de destilación. Utilizar el agua suficiente para que el contenido del matraz sea aproximadamente de 230 ml.

Poner 20 ml de agua destilada en un matraz aforado de 200 ml, que se utilizará para recoger el destilado. A continuación, colocar el matraz en un baño de agua fría (4.1) (entre 10 y 15 ºC en el caso de las bebidas espirituosas anisadas).

Destilar, agitando de vez en cuando el contenido del matraz, hasta que el nivel del destilado se sitúe a unos pocos milímetros por debajo del enrase del matraz aforado de 200 ml.

Dejar el destilado hasta que alcance una temperatura igual a la del líquido inicial, con una aproximación de 0,5 ºC, enrasar a continuación con agua destilada y mezclar cuidadosamente.

Este destilado se utiliza para determinar el grado alcohólico volumétrico (apéndice II).

▼B

Nota: El grado alcohólico volumétrico de la bebida espirituosa es el doble que el del destilado.

▼B

APÉNDICE II. MEDIDA DE LA DENSIDAD ABSOLUTA DEL DESTILADO

MÉTODO A: DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO VOLUMÉTRICO REAL DE LAS BEBIDADS ESPIRITUOSAS POR PICNOMETRÍA

A.1. **Principio**

El grado alcohólico volumétrico se obtiene midiendo por picnometría la densidad absoluta del destilado.

A.2. **Reactivos y materiales**

Durante el análisis, salvo si se especifica lo contrario, deben utilizarse únicamente reactivos de grado analítico y agua de grado por lo menos 3, según se definen en la norma ISO 3696:1987.

A.2.1. Solución de cloruro de sodio (2 % p/v)

Para preparar un litro, pesar 20 g de cloruro de sodio y disolver con agua hasta llegar al volumen.

A.3. **Aparatos y equipo**

Aparatos de laboratorio habituales y, en particular, los siguientes:

A.3.1. Balanza analítica con una sensibilidad de 0,1 mg.

A.3.2. Termómetro esmerilado, graduado en décimas de grado de 10 a 30 ºC. Este termómetro deberá estar certificado o contrastado con un termómetro certificado.

A.3.3. Picnómetro de vidrio pírex, de una capacidad aproximada de 100 ml, con un termómetro móvil esmerilado (A.3.2). Este picnómetro incorpora un tubo lateral de 25 mm de longitud y 1 mm (como máximo) de diámetro interior, terminado en una parte cónica esmerilada. También pueden utilizarse, si se considera apropiado, los picnómetros descritos en la norma ISO 3507, como por ejemplo el de 50 ml.

A.3.4. Un frasco tara del mismo volumen exterior que el picnómetro (con una aproximación inferior a 1 ml) y de masa igual a la del picnómetro lleno de un líquido de densidad absoluta 1,01 (solución de cloruro de sodio, A.2.1).

A.3.5. Un recipiente termostatizado que se ajuste perfectamente al cuerpo del picnómetro.

Nota 1: El método para determinar las densidades absolutas en vacío de las bebidas espirituosas implica la utilización de una balanza de dos platos, un picnómetro y un frasco tara de idéntico volumen exterior a este último para contrarrestar el efecto del empuje del aire en cualquier momento. Esta técnica sencilla puede efectuarse asimismo con una balanza monoplato, siempre que el frasco tara vuelva a pesarse para controlar las variaciones del empuje del aire en distintos momentos.

A.4. **Procedimiento**

Observaciones preliminares:

El procedimiento para determinar el grado alcohólico que se describe a continuación incluye la utilización de un picnómetro de 100 ml, ya que es el que ofrece los resultados más exactos. No obstante, también es posible emplear un picnómetro más pequeño, por ejemplo de 50 ml.

A.4.1. Calibración del picnómetro

La calibración del picnómetro requiere determinar los parámetros siguientes:

— la tara del picnómetro en vacío,

— el volumen del picnómetro a 20 ºC,

— la masa del picnómetro lleno de agua a 20 ºC.

A.4.1.1. Calibración con una balanza monoplato:

Determinar:

— la masa del picnómetro limpio y seco (P),

— la masa del picnómetro lleno de agua a t ºC (P1),

▼B

— la masa del frasco tara (T0).

A.4.1.1.1. Pesar el picnómetro limpio y seco (P).

A.4.1.1.2. Llenar cuidadosamente el picnómetro con agua destilada a temperatura ambiente y colocar el termómetro.

Secar cuidadosamente el picnómetro y colocarlo dentro del recipiente termostatizado. Agitar el recipiente por inversión hasta que el termómetro señale una temperatura constante.

Enrasar exactamente hasta el borde superior del tubo lateral. Leer cuidadosamente la temperatura t ºC y, en caso necesario, corregirla en función de la inexactitud de la escala del termómetro.

Pesar el picnómetro lleno de agua (P1).

A.4.1.1.3. Pesar el frasco tara (T0).

A.4.1.1.4. **Cálculo**

— Tara del picnómetro vacío = P - m

donde m es la masa del aire que contiene el picnómetro

m = 0,0012 × (P1 - P)

Nota 2: 0,0012 es la densidad absoluta del aire seco a 20 ºC y una presión de 760 mm de mercurio.

— Volumen del picnómetro a 20 ºC:

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

donde F_t es el factor para la temperatura t ºC tomado de la tabla 1 del capítulo 1 sobre densidad absoluta y relativa (masa volúmica y densidad relativa) del anexo del Reglamento (CEE) nº 2676/90 (p. 10).

V_{20} ºC debe conocerse con una precisión de 0,001 ml.

— Masa del agua en el picnómetro a 20 ºC:

M_{20} ºC = V_{20} ºC × 0,998203 donde 0,998203 es la densidad absoluta del agua a 20 ºC.

Nota 3: En caso necesario, puede utilizarse el valor de 0,99715 de la densidad absoluta en el aire y calcularse el grado alcohólico volumétrico en relación con la densidad absoluta correspondiente de las tablas del Servicio de aduanas del Reino Unido; en tal caso, no procederá introducir ninguna corrección por la masa de aire desplazada en el picnómetro.

A.4.1.2. Método de calibración con una balanza de dos platos:

A.4.1.2.1. Colocar el frasco tara en el plato izquierdo de la balanza y el picnómetro limpio, seco y con su tapón receptor en el plato derecho. Equilibrar la balanza colocando en el plato donde se encuentre el picnómetro pesas hasta un total de p gramos.

A.4.1.2.2. Llenar cuidadosamente el picnómetro con agua destilada a temperatura ambiente y colocar el termómetro; secar cuidadosamente el picnómetro y colocarlo dentro del recipiente termostatizado; agitar el recipiente por inversión hasta que el termómetro señale una temperatura constante.

Enrasar exactamente hasta el borde superior del tubo lateral. Secar el tubo lateral y colocar el tapón receptor; leer cuidadosamente la temperatura t ºC y, en caso necesario, corregirla en función de la inexactitud de la escala del termómetro.

Pesar el picnómetro lleno de agua; p′ es el peso en gramos con el que se consigue el equilibrio.

A.4.1.2.3. Cálculo

— Tara del picnómetro vacío = p + m

donde m es la masa del aire que contiene el picnómetro

m = 0,0012 × (p - p′)

— Volumen del picnómetro a 20 ºC:

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

donde F_t es el factor para la temperatura t ºC tomado de la tabla 1 del capítulo 1 sobre densidad absoluta y relativa (masa volúmica y densidad relativa) del anexo del Reglamento (CEE) nº 2676/90 (p. 10).

▼B

$V_{20\,°C}$ debe conocerse con una precisión de 0,001 ml.

— Masa del agua en el picnómetro a 20 ºC:

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

donde 0,998203 es la densidad absoluta del agua a 20 ºC.

A.4.2. Determinación del grado alcohólico de la muestra

A.4.2.1. Utilización de una balanza monoplato.

A.4.2.1.1. Pesar el frasco tara, con lo que se obtiene el peso T1.

A.4.2.1.2. Pesar el picnómetro con el destilado preparado (véase el apéndice I); P2 es su peso a t ºC.

A.4.2.1.3. Cálculo

— dT = T1 - T0

— Masa del picnómetro vacío en el momento de la medición

= P - m + dT

— Masa del líquido en el picnómetro a t ºC

= P2 - (P - m + dT)

— Densidad absoluta a t ºC en g/ml

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

— Expresar la densidad absoluta a t ºC en kilogramos por m^3 multiplicando ($\rho_{t\,°C}$ por 1 000, con lo que se obtiene el valor ρ_t.

— Pasar ρ_t a ρ_{20} con arreglo a la tabla de densidades absolutas ρ_T de las mezclas hidroalcohólicas [tabla II del anexo II del Manual de métodos de análisis de la OIV (1994), pp. 17-29].

En la tabla, buscar, en la línea horizontal que corresponde a la temperatura entera T que sea inmediatamente inferior a t ºC, la densidad absoluta más pequeña superior a ρ_t. Utilizar la diferencia tabular que figura por debajo de esa densidad absoluta para calcular la densidad absoluta ρ_t de la bebida espirituosa a la temperatura entera T.

— Mediante la línea que corresponde a esa temperatura entera, calcular la diferencia entre la densidad absoluta ρ' de la tabla inmediatamente superior a ρ_t y la densidad absoluta calculada ρ_t. Dividir la diferencia por la diferencia tabular que figura a la derecha de la densidad absoluta ρ'. El cociente representa la parte decimal del grado alcohólico, cuya parte entera viene indicada en la zona superior de la columna en la que figura la densidad absoluta ρ' (este grado alcohólico se denomina Dt).

Nota 4: Otra posibilidad es mantener el picnómetro en un baño de agua a 20 ºC (± 0,2 ºC) al enrasar.

A.4.2.1.4. Resultado

Utilizando la densidad absoluta ρ_{20}, calcular el grado alcohólico volumétrico real mediante las tablas de grado alcohólico indicadas a continuación:

La tabla que indica el valor del grado alcohólico volumétrico (% vol) a 20 ºC en función de la densidad absoluta a 20 ºC de las mezclas hidroalcohólicas es la tabla internacional adoptada por la Organización Internacional de Metrología en su recomendación nº 22.

A.4.2.2. Utilización de una balanza monoplato.

A.4.2.2.1. Pesar el picnómetro con el destilado preparado (véase el apéndice I); p″ es su peso a t ºC.

A.4.2.2.2. Cálculo

— Masa del líquido en el picnómetro a t ºC

= p + m - p″

▼B

— Densidad absoluta a t ºC en g/ml

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

— Expresar la densidad absoluta a t ºC en kilogramos por m^3 y proceder a la corrección de la temperatura para calcular el grado alcohólico a 20 ºC según lo indicado anteriormente para la balanza monoplato.

A.5. **Características del método (precisión)**

A.5.1. Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos [1] [2].

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	20
Número de muestras	6

Muestras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	19	20	17	19	19	17
Número de valores anómalos (laboratorios)	1	—	2	1	1	3
Número de resultados aceptados	38	40	34	38	38	34
Valor medio ($\bar{x}$) % vol	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) % vol	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Límite de repetibilidad (r) % vol	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) % vol	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Límite de reproducibilidad (R) % vol	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Tipos de muestras:
A Licor de frutas; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
B Brandy; duplicados ciegos.
C Whisky; duplicados ciegos.
D Grappa; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Aquavit; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
F Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

MÉTODO B: DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO VOLUMÉTRICO REAL DE LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR DENSIMETRÍA ELECTRÓNICA (BASADO EN LA FRECUENCIA DE LA OSCILACIÓN DE RESONANCIA DE UNA MUESTRA EN UNA CÉLULA OSCILANTE)

B.1. **Principio**

La densidad absoluta del líquido se determina mediante la medición electrónica del período de oscilación de un tubo vibratorio en U. Para efectuar este tipo de medición, la muestra se introduce en el sistema oscilante (tubo en U) cuya frecuencia de oscilación específica se ve consiguientemente modificada por la masa añadida.

▼B

B.2. **Reactivos y materiales**

Durante el análisis, salvo si se especifica lo contrario, deben utilizarse únicamente reactivos de grado analítico y agua de grado por lo menos 3, según se definen en la norma ISO 3696:1987.

B.2.1. Acetona (CAS 666-52-4) o alcohol absoluto.

B.2.2. Aire seco.

B.3. **Aparatos y equipo**

Aparatos de laboratorio habituales y, en particular, los siguientes:

B.3.1. Densímetro digital

Para efectuar estas mediciones deberá emplearse un densímetro digital capaz de expresar la densidad absoluta en g/ml con una precisión de cinco decimales.

Nota 1: El densímetro deberá colocarse en un soporte perfectamente estable protegido de toda vibración.

B.3.2. Regulación de la temperatura

El funcionamiento del densímetro sólo será válido si la célula de medida se conecta a un dispositivo integrado de regulación térmica que permita obtener una estabilidad de temperatura de al menos ± 0,02 ºC.

Nota 2: La regulación y el control precisos de la temperatura en la célula de medida son sumamente importantes, ya que un error de 0,1 ºC puede producir una variación de densidad absoluta del orden de 0,1 kg/m^3.

B.3.3. Jeringas para inyección de muestras o muestreador automático.

B.4. **Procedimiento**

B.4.1. Calibración del densímetro

Al utilizarse por primera vez, el aparato deberá calibrarse siguiendo las instrucciones de su fabricante. Deberá volverse a calibrar periódicamente y compararse con un patrón de referencia certificado o con una solución de referencia interna del laboratorio ligada a un patrón de referencia certificado.

B.4.2. Determinación de la densidad absoluta de la muestra

B.4.2.1. En caso necesario y antes de realizar la medida, limpiar la célula con acetona o alcohol absoluto y secarla con aire seco. Lavar la célula con la muestra.

B.4.2.2. Inyectar la muestra en la célula (mediante una jeringa o un muestreador automático) hasta que se encuentre completamente llena. Durante la operación de llenado, comprobar que no queda ninguna burbuja de aire. La muestra deberá ser homogénea y no contener ninguna partícula sólida. Toda materia en suspensión deberá eliminarse por filtración antes del análisis.

B.4.2.3. Una vez estabilizada la lectura, anotar la densidad absoluta ρ_{20} o el grado alcohólico indicado por el densímetro.

B.4.3. Resultado

Cuando se utilice la densidad absoluta ρ_{20}, calcular el grado alcohólico volumétrico real mediante las tablas de grado alcohólico que se indican a continuación:

La tabla que indica el valor del grado alcohólico volumétrico (% vol) a 20 ºC en función de la densidad absoluta a 20 º C de las mezclas hidroalcohólicas es la tabla internacional adoptada por la Organización Internacional de Metrología en su recomendación nº 22.

B.5. **Características del método (precisión)**

B.5.1. Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos [1] [2].

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	16

▼B

Número de muestras 6

Muestras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómales	11	13	15	16	14	13
Número de valores anómales (laboratorios)	2	3	1	—	1	2
Número de resultados aceptados	22	26	30	32	28	26
Valor medio ($\bar{x}$) % vol	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) % vol	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Límite de repetibilidad (r) % vol	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) % vol	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Límite de reproducibilidad (R) % vol	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Tipos de muestras:
A Licor de frutas; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
B Brandy; duplicados ciegos.
C Whisky; duplicados ciegos.
D Grappa; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Aquavit; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferente) (*).
F Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

MÉTODO C: DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO VOLUMÉTRICO REAL DE LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR DENSIMETRÍA CON BALANZA HIDROSTÁTICA

C.1. **Principio**

El grado alcohólico de las bebidas espirituosas puede medirse por densimetría, utilizando una balanza hidrostática basada en el principio de Arquímedes, según el cual un cuerpo sumergido en un líquido recibe de ese líquido un empuje vertical hacia arriba igual al peso del líquido desplazado.

C.2. **Reactivos y materiales**

Durante el análisis, salvo si se especifica lo contrario, deben utilizarse únicamente reactivos de grado analítico y agua de grado por lo menos 3, según se definen en la norma ISO 3696:1987.

C.2.1. Solución de lavado del flotador (hidróxido sódico, 30 % p/v).

Para preparar 100 ml, pesar 30 g de hidróxido sódico y enrasar con etanol de 96 %.

C.3. **Aparatos y equipo**

Aparatos de laboratorio habituales y, en particular, los siguientes:

C.3.1. Balanza hidrostática monoplato con una sensibilidad de 1 mg.

C.3.2. Flotador de un volumen mínimo de 20 ml, especialmente adaptado a la balanza, suspendido por un hilo de diámetro inferior o igual a 0,1 mm.

C.3.3. Probeta con una marca de nivel. El flotador deberá poder introducirse por completo en el volumen de la probeta situado por debajo de la marca; la superficie del líquido sólo podrá ser atravesada por el hilo

▼B

de suspensión. La probeta deberá tener un diámetro interno superior en 6 mm, como mínimo, al del flotador.

C.3.4. Termómetro (o sonda para medir la temperatura) graduado en grados y décimas de grado, de 10 a 40 ºC, calibrado con una precisión de 0,05 ºC.

C.3.5. Pesas, calibradas por un organismo certificador reconocido.

Nota 1: También puede utilizarse una balanza de dos platos; el principio se describe en el capítulo 1 sobre densidad absoluta y relativa (masa volúmica y densidad relativa) del anexo del Reglamento (CEE) nº 2676/90 (p. 7).

C.4. **Procedimiento**

Después de cada medición, el flotador y la probeta deberán limpiarse con agua destilada, secarse con papel suave de laboratorio que no deje fibras y aclararse con la solución cuya densidad absoluta se trata de determinar. Las mediciones se realizarán en cuanto el aparato haya alcanzado su estabilidad con objeto de limitar las pérdidas de alcohol por evaporación.

C.4.1. Calibrado de la balanza

Aunque las balanzas poseen generalmente un sistema de calibrado interno, la balanza hidrostática debe poder calibrarse con pesas controladas por un organismo certificador oficial.

C.4.2. Calibración del flotador

C.4.2.1. Llenar la probeta hasta la marca de nivel con agua bidestilada (o de pureza equivalente, por ejemplo agua microfiltrada de conductividad 18,2 MΩ/cm) a una temperatura comprendida entre 15 y 25 ºC, pero preferentemente de 20 ºC.

C.4.2.2. Sumergir el flotador y el termómetro, agitar, leer la densidad absoluta del líquido en el aparato y, en caso necesario, corregir esta lectura para que coincida con la del agua a la temperatura de la medición.

C.4.3. Control con una solución hidroalcohólica

C.4.3.1. Llenar la probeta hasta la marca de nivel con una solución hidroalcohólica de título conocido a una temperatura comprendida entre 15 y 25 ºC pero, preferentemente, de 20 ºC.

C.4.3.2. Sumergir el flotador y el termómetro, agitar y leer la densidad absoluta del líquido en el aparato (o el grado alcohólico, si el aparato lo permite). El grado alcohólico determinado de este modo debería ser el mismo que el anterior.

Nota 2: Esta solución de grado alcohólico conocido también puede servir, en lugar del agua bidestilada, para calibrar el flotador.

C.4.4. Medición de la densidad absoluta de un destilado (o de su grado alcohólico, si el aparato lo permite)

C.4.4.1. Verter la muestra en la probeta hasta la marca de nivel.

C.4.4.2. Sumergir el flotador y el termómetro, agitar y leer la densidad absoluta del líquido en el aparato (o el grado alcohólico, si el aparato lo permite). Anotar la temperatura si la densidad absoluta se mide a t ºC (ρ_t).

C.4.4.3. Pasar ρ_t a ρ_{20}, con arreglo a la tabla de densidades absolutas ρ_T de las mezclas hidroalcohólicas [tabla II del anexo II del Manual de métodos de análisis de la OIV (1994), pp. 17-29].

C.4.5. Limpieza del flotador y de la probeta

C.4.5.1. Sumergir el flotador en la solución de lavado contenida en la probeta.

C.4.5.2. Dejar en remojo durante una hora, haciendo girar el flotador periódicamente.

C.4.5.3. Aclarar con agua abundante, primero corriente y después destilada.

C.4.5.4. Secar con papel de laboratorio suave, que no deje fibras.

Esta operación se realizará cuando se utilice el flotador por primera vez y, posteriormente, con la periodicidad necesaria.

C.4.6. Resultado

Utilizando la densidad absoluta ρ_{20} calcular el grado alcohólico volumétrico real mediante las tablas de grado alcohólico indicadas a continuación:

▼B

La tabla que indica el valor del grado alcohólico volumétrico (% vol) a 20 ºC en función de la densidad absoluta a 20 ºC de las mezclas hidroalcohólicas es la tabla internacional adoptada por la Organización Internacional de Metrología en su recomendación nº 22.

C.5. **Características del método (precisión)**

C.5.1. Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos [1] [2].

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	12
Número de muestras	6

Muestras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	12	10	11	12	11	9
Número de valores anómalos (laboratorios)	—	2	1	—	1	2
Número de resultados aceptados	24	20	22	24	22	18
Valor medio ($\bar{x}$) % vol	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) % vol	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Límite de repetibilidad limit (r) % vol	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) % vol	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Límite de reprodubilidad (R) % vol	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Tipos de muestras:
A Licor de frutas; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente) (*).
B Brandy; duplicados ciegos.
C Whisky; duplicados ciegos.
D Grappa; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Aquavit; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
F Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

▼B

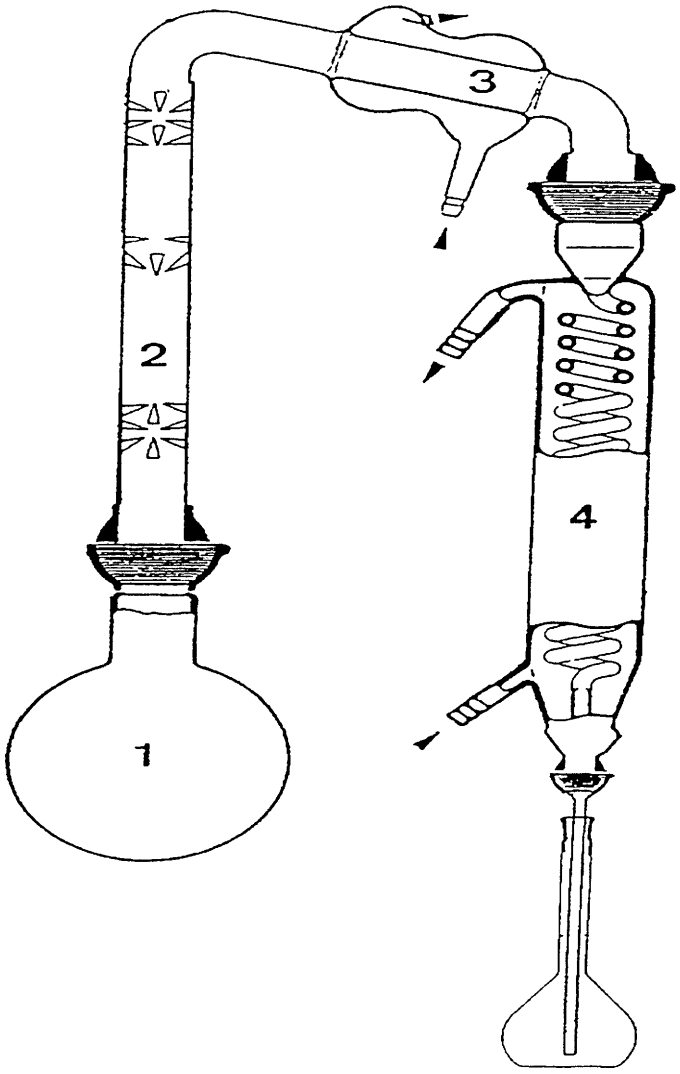


Figura 1: Aparato de destilación para medir el grado alcohólico volumétrico real de las bebidas espirituosas

1. Matraz de fondo redondo de un litro de capacidad con esmerilado esférico normalizado.
2. Columna rectificadora de Vigreux, de 20 cm de altura.
3. Condensador de bordes rectos de West, de 10 cm de largo.
4. Refrigerante de serpentín de 40 cm de largo.

▼B

II. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO TOTAL DE LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR GRAVIMETRÍA

1. Ámbito de aplicación

El Reglamento (CEE) nº 1576/89 restringe la utilización de este método al aquavit, bebida cuyo extracto seco está limitado a 15 g/l.

2. Referencias normativas

ISO 3696:1987: Agua para fines analíticos — especificaciones y métodos de ensayo.

3. Definición

Por extracto seco total (o materia seca total) se entiende el conjunto de sustancias que no se volatilizan en determinadas condiciones físicas.

4. Principio

Pesada del residuo de evaporación de la bebida espirituosa al baño de agua hirviente y secado en una estufa.

5. Aparatos y equipo

5.1. Cápsula cilíndrica de evaporación de fondo plano, de 55 mm de diámetro.

5.2. Baño de agua hirviente.

5.3. Pipeta de 25 ml de clase A.

5.4. Estufa.

5.5. Desecador.

5.6. Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.

6. Toma de muestras

Antes de los análisis, las muestras deberán estar almacenadas a temperatura ambiente.

7. Procedimiento

7.1. Pipetear en una cápsula cilíndrica de evaporación de fondo plano de 55 mm de diámetro, previamente pesada, 25 ml de bebida espirituosa con menos de 15 g/l de materia seca. Durante la primera hora de evaporación, la cápsula deberá colocarse sobre la tapadera de un baño de agua hirviente a fin de que el líquido no entre en ebullición, lo que podría provocar pérdidas por proyección. Dejar una hora más en contacto directo con el vapor del baño de agua hirviente.

7.2. Terminar la desecación colocando la cápsula en una estufa a 105 ºC + 3 ºC durante dos horas. Dejar que la cápsula se enfríe en un desecador y pesar la cápsula y su contenido.

8. Cálculo

La masa del residuo obtenido multiplicada por 40 es igual al extracto seco contenido en la bebida espirituosa, el cual debe expresarse en g/l, con una precisión de un decimal.

9. Características del método (precisión)

9.1. Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos [1] [2].

▼B

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	10
Número de muestras	4

Muestras	A	B	C	D
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	9	9	8	9
Número de valores anómalos (laboratorios)	1	1	2	—
Número de resultados aceptados	18	18	16	18
Valor medio ($\bar{x}$) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Límite de repetibilidad (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Desviación típica de la repetibilidad (S_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Límite de reproducibilidad (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes).
C Grappa; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente differentes).
D Aquavit; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente differentes).

▼B

III. DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS VOLÁTILES DE LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS

III.1. CONSIDERACIONES GENERALES

1. DEFINICIONES

El Reglamento (CEE) nº 1576/89 fija los niveles mínimos de compuestos volátiles distintos del etanol y el metanol para una serie de bebidas espirituosas (ron, aguardientes de origen vitícola, aguardientes de frutas, etc.). Por convención y, exclusivamente en el caso de los productos de este tipo, este contenido se considera equivalente a la suma de las concentraciones de:

1) ácidos volátiles, expresados en ácido acético,

2) aldehídos expresados en etanal, como suma de etanal (acetaldehído) y de la fracción de etanal contenida en 1,1-dietoxietano (acetal),

3) los alcoholes superiores siguientes: propan-1-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metilpropan-1-ol, determinados por separado, y 2-metilbutan-1-ol y 3-metilbutan-1-ol, determinados juntos o por separado,

4) acetato de etilo.

Los métodos convencionales que permiten medir los compuestos volátiles son los siguientes:

— los ácidos volátiles se determinan mediante la acidez volátil,

— los aldehídos (etanal y acetal), el acetato de etilo y los alcoholes se determinan por cromatografía de gases (CG).

2. ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Los análisis por cromatografía de gases de compuestos volátiles distintos de los anteriormente mencionados pueden resultar especialmente interesantes para determinar tanto el origen de la materia prima utilizada para la destilación como las condiciones en las que ésta se haya realizado.

Algunas bebidas espirituosas contienen otros componentes volátiles, como los compuestos aromáticos, que son característicos de las materias primas utilizadas para obtener el alcohol, del aroma de la bebida espirituosa y de las particularidades de su preparación. Estos compuestos resultan importantes en lo que respecta a la evaluación de las prescripciones del Reglamento (CEE) nº 1576/89.

III.2. DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LOS CONGÉNERES VOLÁTILES DE LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS

1. Ámbito de aplicación

Este método es adecuado para determinar, mediante cromatografía de gases, la presencia en las bebidas espirituosas de 1,1-dietoxietano (acetal), 2-metilbutan-1-ol (alcohol amílico), 3-metilbutan-1-ol (alcohol isoamílico), metanol (alcohol metílico), etanoato de etilo (acetato de etilo), butan-1-ol (n-butanol), butan-2-ol (sec-butanol), 2-metilpropan-1-ol (alcohol isobutílico), propan-1-ol (n-propanol) y etanal (acetaldehído). El método utiliza un patrón interno, como por ejemplo pentan-3-ol. Las concentraciones de los analitos se expresan en gramos por hectolitro de alcohol absoluto; antes del análisis es preciso determinar el grado alcohólico del producto. Las bebidas espirituosas que pueden analizarse con este método incluyen el whisky, el brandy, el ron, el aguardiente de vino, el aguardiente de fruta y el aguardiente de orujo.

2. Referencias normativas

ISO 3696:1987: Agua para fines analíticos — Especificaciones y métodos de ensayo.

3. Definición

Los congéneres volátiles son las sustancias que se forman junto con el etanol durante la fermentación, la destilación y el envejecimiento de las bebidas espirituosas.

▼B

4. **Principio**

La presencia de congéneres volátiles en las bebidas espirituosas se determina mediante la inyección de la bebida espirituosa, pura o adecuadamente diluida, en un sistema de cromatografía de gases (CG). Antes de la inyección, se añade a la bebida espirituosa un patrón interno adecuado. Los congéneres volátiles se separan en una columna adecuada utilizando la programación de la temperatura y se detectan mediante un detector de ionización de llama (FID). La concentración de cada uno de los congéneres se determina en relación con el patrón interno a partir de los factores de respuesta obtenidos durante la calibración en condiciones cromatográficas idénticas a las del análisis de la bebida espirituosa.

5. **Reactivos y materiales**

Salvo si se especifica lo contrario, deberán utilizarse únicamente reactivos de una pureza superior al 97 %, suministrados por un proveedor acreditado por la ISO, con certificado de pureza, libres de otros congéneres volátiles en la dilución de ensayo (extremo que podrá confirmarse mediante la inyección de un patrón de cada uno de los congéneres en la dilución de ensayo, en las condiciones cromatográficas indicadas en el punto 6.4), y agua de grado al menos 3, según se define en la norma ISO 3696. El acetal y el acetaldehído deberán almacenarse protegidos de la luz a una temperatura inferior a 5 ºC; los demás reactivos podrán almacenarse a temperatura ambiente.

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

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

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

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

5.5. Patrones internos aceptables: pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-metilpentan-1-ol (CAS 626-89-1) o nonanoato de metilo (CAS 1731-84-6).

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

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

5.8. Acetato de etilo (CAS 141-78-6).

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

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

5.11. Acetaldehído (CAS 75-07-0).

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

5.13. Solución de etanol al 40 % v/v.

Para preparar una solución de etanol de 400 ml/l, poner 400 ml de etanol (5.1) en un matraz aforado de 1 l, enrasar con agua destilada y mezclar bien.

5.14. Preparación y conservación de las soluciones patrón (procedimiento utilizado para el método validado)

Todas las soluciones patrón deberán almacenarse a una temperatura inferior a 5 ºC y renovarse cada mes. Las masas de los componentes y las soluciones deberán registrarse con una precisión de 0,1 mg.

5.14.1. Solución patrón — A

Pipetear los componentes que se indican más adelante en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 60 ml de solución de etanol (5.13), para reducir al máximo la evaporación de los componentes, enrasar con solución de etanol (5.13) y mezclar cuidadosamente. Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

Componente	Volumen (ml)
Metanol (5.2)	3,0
Propan-1-ol (5.3)	3,0
2-metilpropan-1-ol (5.4)	3,0
2-metilbutan-1-ol (5.6)	3,0
3-metilbutan-1-ol (5.7)	3,0

▼B

Componente	Volumen (ml)
Acetato de etilo (5.8)	3,0
Butan-1-ol (5.9)	3,0
Butan-2-ol (5.10)	3,0
Acetaldehído (5.11)	3,0
Acetal (5.12)	3,0

Nota 1: Es preferible añadir el acetal y el acetaldehído en último lugar para reducir al máximo la pérdida de estas sustancias por evaporación.

5.14.2. Solución patrón — B

Pipetear 3 ml de pentan-3-ol u otro patrón interno adecuado (5.5) en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 80 ml de solución de etanol (5.13), enrasar con solución de etanol (5.13) y mezclar cuidadosamente.

Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

5.14.3. Solución patrón — C

Pipetear 1 ml de solución A (5.14.1) y 1 ml de solución B (5.14.2) en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 80 ml de solución de etanol (5.13), enrasar con solución de etanol (5.13) y mezclar cuidadosamente.

Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

5.14.4. Solución patrón — D

Para mantener la continuidad analítica, preparar un patrón de control de calidad utilizando el patrón A ya preparado (5.14.1). Pipetear 1 ml de solución A (5.14.1) en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 80 ml de solución de etanol (5.13), enrasar con solución de etanol (5.13) y mezclar cuidadosamente.

Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

5.14.5. Solución patrón — E

Pipetear 10 ml de solución B (5.14.2) en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 80 ml de solución de etanol (5.13), enrasar con solución de etanol (5.13) y mezclar cuidadosamente.

Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

5.14.6. Soluciones patrón utilizadas para comprobar la linealidad de la respuesta del detector de ionización de llama

En una serie de matraces aforados de 100 ml que contengan aproximadamente 80 ml de etanol (5.13), pipetear 0, 0,1, 0,5, 1,0 y 2,0 ml de solución A (5.14.1) y 1 ml de solución B (5.14.2), enrasar con solución de etanol (5.13) y mezclar cuidadosamente.

Anotar el peso de cada matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

5.14.7. Solución patrón de control de calidad (CC)

Pipetear 9 ml de solución patrón D (5.14.4) y 1 ml de solución patrón E (5.14.5) en un matraz y mezclar cuidadosamente.

Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

6. **Aparatos y equipo**

6.1. Equipo capaz de medir la densidad absoluta y el grado alcohólico.

6.2. Balanza analítica con precisión de 0,1 mg.

6.3. Cromatógrafo de gases con programación de temperatura, equipado con un detector de ionización de llama y un integrador u otro sistema de tratamiento de datos capaz de medir las áreas o las alturas de los picos.

▼B

6.4. Una o varias columnas de cromatografía de gases, capaces de separar los analitos de forma que la resolución mínima entre los distintos componentes (excepto el 2-metilbutan-1-ol y el 3-metilbutan-1-ol) sea por lo menos de 1,3.

Nota 2: Las siguientes columnas y condiciones cromatográficas son ejemplos que se consideran adecuados para esta determinación:

1) Una precolumna de 1 m x 0,32 mm de diámetro interior (d.i.), unida a una columna de CP-WAX 57 CB de 50 m x 0,32 mm d.i., con una película de 0,2 µm de espesor (polietilenglicol estabilizado) seguida por una columna de Carbowax 400 de 50 m x 0,32 mm d.i. con una película de 0,2 (µm de espesor. (Las columnas se conectan mediante piezas a presión).

Gas portador y presión:	helio (135 kPa)
Temperatura de la columna:	35 ºC durante 17 min, de 35 a 70 ºC a 12 ºC/min, mantener a 70 ºC durante 25 min
Temperatura del inyector:	150 ºC
Temperatura del detector:	250 ºC
Volumen de inyección:	1 µl, fraccionamiento (split) 20 a 100:1

2) Una precolumna de 1 m x 0,32 mm d.i., unida a una columna de CP-WAX 57 CB de 50 m x 0,32 mm d.i., con una película de 0,2 µm de espesor (polietilenglicol estabilizado) (la precolumna se conecta mediante una pieza a presión).

Gas portador y presión:	helio (65 kPa)
Temperatura de la columna	35 ºC durante 10 min, de 35 a 110 ºC a 5 ºC/min., 110 a 190 ºC a 30 ºC/min., mantener a 190 ºC durante 2 min
Temperatura del inyector:	260 ºC
Temperatura del detector:	300 ºC
Volumen de inyección:	1 µl, fraccionamiento (split) 55:1

3) Columna empacada (5 % CW 20M, Carbopack B), 2 m x 2 mm d.i.

Temperatura de la columna:	65 ºC durante 4 min., 65 a 140 ºC a 10 ºC/min, mantener a 140 ºC durante 5 min, de 140 a 150 ºC a 5 ºC/min, mantener a 150 ºC durante 3 min
Temperatura del inyector:	65 ºC
Temperatura del detector:	200 ºC
Volumen de inyección:	1 µl

7. **Toma de muestras**

7.1. Muestra de laboratorio

En cuanto se reciben las muestras, se mide el grado alcohólico de cada una de ellas (6.1).

8. **Procedimiento utilizado para el método validado**

8.1. Preparación de la muestra

8.1.1. Pesar un matraz adecuado, debidamente tapado, y anotar su peso.

▼B

8.1.2. Pipetear 9 ml de la muestra de laboratorio en el matraz y anotar el peso ($M_{MUESTRA}$).

8.1.3. Añadir 1 ml de la solución patrón E (5.14.5) y anotar el peso (M_{PI}).

8.1.4. Agitar la muestra vigorosamente (realizando por lo menos 20 inversiones). Las muestras deberán almacenarse a una temperatura inferior a 5 ºC antes de su análisis para reducir al máximo las pérdidas de sustancias volátiles.

8.2. Ensayo en blanco

8.2.1. Con la balanza analítica de 0,1 mg de precisión (6.2), pesar un matraz adecuado, debidamente tapado, y anotar el peso.

8.2.2. Pipetear 9 ml de solución de etanol de 400 ml/l (5.13) en el matraz y anotar el peso.

8.2.3. Añadir 1 ml de la solución patrón E (5.14.5) y anotar el peso.

8.2.4. Agitar la disolución vigorosamente (realizando por lo menos 20 inversiones). Las muestras deberán almacenarse a una temperatura inferior a 5 ºC antes de su análisis para reducir al máximo las pérdidas de sustancias volátiles.

8.3. Ensayo preliminar

Inyectar la solución patrón C (5.14.3) para comprobar que todos los analitos se separan con una resolución mínima de 1,3 (excepto el 2-metilbutan-1-ol y el 3-metilbutan-1-ol).

8.4. Calibración.

Debe comprobarse la calibración con arreglo al procedimiento que se describe a continuación. Comprobar que la respuesta es lineal analizando sucesivamente por triplicado cada una de las soluciones patrón de linealidad (5.14.6) que contienen el patrón interno (PI). A partir de las áreas o las alturas de los picos dadas por el integrador, calcular para cada inyección la relación R de cada congénere, y trazar la curva de R frente a la proporción de la concentración de congénere respecto a la del patrón interno (PI), C. Deberá obtenerse una gráfica lineal, con un coeficiente de correlación de por lo menos 0,99.

$$R = \frac{\text{Área o altura del pico del congénere}}{\text{Área o altura del pico del PI}}$$

$$C = \frac{\text{Concentración del congénere (µg / g)}}{\text{Concentración del PI (µg / g)}}$$

8.5. Determinación

Inyectar la solución patrón C (5.14.3) y dos soluciones patrón de CC (5.14.7). Proseguir con las muestras problema (preparadas con arreglo a los puntos 8.1 y 8.2), insertando un patrón de CC cada 10 muestras para garantizar la estabilidad analítica. Inyectar una solución patrón C (5.14.3) cada 5 muestras.

9. **Cálculo**

Puede utilizarse un sistema automatizado de tratamiento de datos, siempre que éstos puedan comprobarse con arreglo a los principios descritos en el método que se detalla a continuación.

Medir las áreas o las alturas de los picos de los congéneres y de los patrones internos.

9.1. Cálculo del factor de respuesta

A partir del cromatograma de la inyección de solución patrón C (5.14.3), calcular los factores de respuesta para cada congénere mediante la ecuación (1).

$$(1)\ \text{Factor de respuesta} = \frac{\text{Área o altura del pico del PI}}{\text{Área o altura del pico del congénere}} \times \frac{\text{Conc. congénere (µg / g)}}{\text{Con. PI (µg / g)}}$$

donde:

PI = patrón interno

▼B

Conc. congénere = concentración de congénere en la solución C (5.14.3)

Conc. PI = concentración de patrón interno en la solución C (5.14.3).

9.1.2. Análisis de las muestras

Mediante la ecuación (2), calcular la concentración de cada uno de los congéneres en las muestras.

(2) Congcentraciones de los congéneres (µg/g) =

$$\frac{\text{Área o altura del pico del congénere}}{\text{Área o altura del pico del PI}} \times \frac{M_{PI}\ (g)}{M_{MUESTRA}\ (g)} \times \text{Conc. PI (µg / g)} \times \text{FR}$$

donde:

$M_{MUESTRA}$ = peso de la muestra (8.1.2)

M_{PI} = del patrón interno (8.1.3)

Conc. PI = concentración de patrón interno en la solución E (5.14.5)

FR = factor de respuesta calculado mediante la ecuación (1).

9.1.3. Análisis de la solución patrón de control de calidad

Mediante la ecuación (3), calcular el porcentaje de recuperación del valor objetivo para cada uno de los congéneres contenidos en los patrones de control de calidad (5.14.7).

$$\text{(3) \% recuperación de la muestra de} = \frac{\text{concentración del analito en el patrón de CC}}{\text{concentración del analito en la solución D}} \times 100$$

La concentración del analito en el patrón de control de calidad se calcula mediante las ecuaciones (1) y (2).

9.2. Presentación final de los resultados

Los resultados se convierten de g/g a g/hl de alcohol absoluto para las muestras mediante la ecuación (4):

(4) Concentración en g/hl de alcohol absoluto =

$$\text{Conc (µg / g)} \times \rho \times 10/[\text{grado (\% vol)} \times 1\ 000]$$

donde

ρ = densidad absoluta en Kg/m^3.

Los resultados se presentan con tres cifras significativas y un máximo de un decimal, por ejemplo 11,4 g/hl de alcohol absoluto.

10. **Garantía y control de calidad utilizados para el método validado**

Mediante la ecuación (2), calcular la concentración de cada congénere en las soluciones patrón de control de calidad preparadas con arreglo al procedimiento indicado en los puntos 8.1.1 a 8.1.4. Mediante la ecuación (3), calcular el porcentaje de recuperación del valor objetivo. Si los resultados analizados se sitúan en un margen del ± 10 % respecto a sus valores teóricos para cada congénere, puede considerarse válido el análisis. En caso contrario, deberá procederse a una investigación para hallar la causa de las inexactitudes y adoptar las medidas correctoras correspondientes.

11. **Características del método (precisión)**

Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios. Los cuadros siguientes recogen los valores correspondientes a los siguientes compuestos: etanal, acetato de etilo, acetal, etanal total, metanol, butan-2-ol, propan-1-ol, butan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-butan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol.

▼B

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	Etanol

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	28	26	27	27	28
Número de valores anómales (laboratorios)	2	4	3	3	2
Número de resultados aceptados	56	52	54	54	56
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8 (*)	28,6 52,2 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Límite de repetibilidad (r) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicación contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	Acetat de etilo

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	24	24	25	24	24
Número de valores anómalos (laboratorios)	2	2	1	2	2
Número de resultados aceptados	48	48	50	48	48
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Límite de repetibilidad (r) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3

▼B

Muestras	A	B	C	D	E
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	Acetal

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	20	21	22	17	21
Número de valores anómalos (laboratorios)	4	3	2	4	3
Número de resultados aceptados	40	42	44	34	42
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60 (*)	15,1 28,3 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Límite de repetibilidad (r) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	Etanal total

▼B

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	23	19	22	21	22
Número de valores anómalos (laboratorios)	1	5	2	3	2
Número de resultados aceptados	46	38	44	42	44
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8 (*)	32,7 61,8 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Límite de repetibilidad (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	Metanol

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	26	27	27	28	25
Número de valores anómalos (laboratorios)	4	3	3	1	4
Número de resultados aceptados	52	54	54	56	50
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Límite de repetibilidad (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

▼B

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	4
Analito	Butan-2-ol

Muestras	A	B	C	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	21	27	29	22
Número de valores anómalos (laboratorios)	4	3	1	3
Número de resultados aceptados	42	54	58	44
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Límite de repetibilidad (r) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	Propan-1-ol

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	29	27	27	29	29
Número de valores anómalos (laboratorios)	2	4	3	2	2
Número de resultados aceptados	58	54	54	58	58
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3

▼B

Muestras	A	B	C	D	E
Desviación típica relativa a la repetibilidad (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Límite de repetibilidad (r) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	3
Analito	Butan-1-ol

Muestras	A	B	C
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	20	22	22
Número de valores anómalos (laboratorios)	4	4	6
Número de resultados aceptados	40	44	44
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	0,43	0,20	0,43
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Límite de repetibilidad (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	2-metilpropan-1-ol

▼B

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	28	31	30	26	25
Número de valores anómalos (laboratorios)	3	0	1	5	6
Número de resultados aceptados	56	62	60	52	50
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0 246,8 (*)	115,99 133,87 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Límite de repetibilidad (r) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	2-metilbutan-1-ol

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	25	26	25	27	25
Número de valores anómalos (laboratorios)	3	2	3	1	2
Número de resultados aceptados	50	52	50	54	50
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2 (*)	39,5 61,5 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Desviación típica relativa a la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Límite de repetibilidad (r) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

▼B

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

Año del estudio interlaboratorios	1997
Número de laboratorios	32
Número de muestras	5
Analito	3-metylbutan-1-ol

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	23	23	24	27	21
Número de valores anómalos (laboratorios)	5	5	4	1	6
Número de resultados aceptados	46	46	48	54	42
Valor medio ($\bar{x}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Límite de repetibilidad (r) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Límite de reproducibilidad (R) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Tipos de muestras:
A Brandy; duplicados ciegos.
B Kirsch; duplicados ciegos.
C Grappa; duplicados ciegos.
D Whisky; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes (*).
E Ron; duplicados con subniveles (duplicados con contenidos ligeramente diferentes) (*).

▼M1

V. ANETOL. DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE TRANS-ANETOL EN BEBIDAS ESPIRITUOSAS

1. Ámbito de aplicación

Este método es adecuado para la determinación de trans-anetol en bebidas espirituosas anisadas mediante cromatografía capilar de gases.

2. Referencias normativas

ISO 3696: 1987 Agua para uso en laboratorio de análisis — Especificaciones y métodos de prueba.

3. Principio

La concentración de trans-anetol en la bebida espirituosa se determina por cromatografía de gases (CG). Se añade la misma cantidad de un patrón interno, por ejemplo 4-alil-anisol (estragol) si no hay estragol presente de forma natural en la muestra, tanto a la muestra problema como a una solución de referencia de trans-anetol de concentración conocida, se diluyen ambas con solución de etanol al 45 % y se inyectan directamente en el sistema de CG. Es necesario proceder a una extracción antes de la preparación de la muestra y del análisis en caso de que el licor contenga gran cantidad de azúcares.

4. Reactivos y material

Durante el análisis deben utilizarse exclusivamente reactivos de una pureza mínima del 98 %. El agua debe ser al menos de grado 3 según la definición de la norma ISO 3696.

Las sustancias de referencia deben conservarse refrigeradas (a unos 4 ºC), protegidas de la luz, en recipientes de aluminio o en frascos de vidrio topacio. Es preferible que los tapones tengan un cierre de aluminio. Hay que fundir el trans-anetol a partir de su estado cristalino antes de utilizarlo, pero en este caso su temperatura no debe superar nunca los 35 ºC.

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

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

4.3. 4-alilanisol (estragol) (CAS 140-67-0), patrón interno recomendado (PI)

4.4. Etanol al 45 % vol.

Añadir 560 g de agua destilada a 378 g de etanol al 96 % vol.

4.5. Preparación de las soluciones de patrón

Todas las soluciones de patrón deben conservarse a temperatura ambiente (15-35 ºC), protegidas de la luz en recipientes de aluminio o en frascos de vidrio topacio. Es preferible que los tapones tengan un cierre de aluminio.

El trans-anetol y el 4-alilanisol son prácticamente insolubles en agua, por lo que es necesario disolverlos en una porción de etanol al 96 % (4.1) antes de la adición de etanol al 45 % (4.4).

Las soluciones madre deben prepararse de nuevo cada semana.

4.5.1. Solución de patrón A

Solución madre de trans-anetol (concentración: 2 g/l)

Pesar 40 mg de trans-anetol (4.2) en un matraz aforado de 20 ml (o 400 mg en 200 ml, etc.). Añadir una porción de etanol al 96 % (4.1), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

4.5.2. Solución de patrón interno B

Solución madre de patrón interno, por ejemplo, estragol (concentración: 2 g/l)

Pesar 40 mg de estragol (4.3) en un matraz aforado de 20 ml (o 400 mg en 200 ml, etc.). Añadir una porción de etanol al 96 % (4.1), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

▼M1

4.5.3. Soluciones utilizadas para comprobar la linealidad de la respuesta del detector de ionización de llama (DIL)

Debe comprobarse la linealidad de la respuesta del DIL en el análisis teniendo en cuenta una gama de concentraciones de trans-anetol en bebidas espirituosas entre 0 g/l y 2,5 g/l. En el procedimiento de análisis, las muestras problema de bebidas espirituosas analizadas deben diluirse 10 veces (8.3). En las condiciones del análisis descritas en el método, deben prepararse de la forma siguiente soluciones madre correspondientes a las concentraciones de 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 y 0,25 g/l de trans-anetol en la muestra analizada: tomar con pipeta 0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5 ml de solución madre A (4.5.1) y pasarlos a una serie de matraces aforados de 20 ml; pipetear en cada matraz 2 ml de solución de patrón interno B (4.5.2), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

Se utilizará como solución de 0 g/l la solución en blanco (8.4).

4.5.4. Solución de patrón C

Tomar con pipeta 2 ml de solución de patrón A (4.5.1) y pasarlos a un matraz aforado de 20 ml; añadir después 2 ml de solución de patrón interno B (4.5.2), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

5. **Aparatos y equipo**

5.1. Cromatógrafo capilar de gases equipado con un detector de ionización de llama (DIL) y un integrador u otro sistema de tratamiento de datos que pueda medir alturas o áreas de picos, así como un muestreador automático o el equipo necesario para la inyección manual de muestras.

5.2. Inyector de tipo split/splitless (con/sin fraccionamiento)

5.3. Columna capilar como, por ejemplo, la siguiente:

Longitud: 50 m,

Diámetro interno: 0,32 mm,

Espesor de capa: 0,2 μm,

Fase estacionaria: FFAP — polímero poroso de unión cruzada polietilenglicol —TPA modificado.

5.4. Material corriente de laboratorio: material de vidrio para volumetría de grado A, balanza analítica (precisión: ± 0,1 mg).

6. **Condiciones cromatográficas**

El tipo y las dimensiones de la columna, así como las condiciones de cromatografía de gases deben ser tales que el anetol y el patrón interno se separen entre sí y de las eventuales sustancias interferentes. Como condiciones típicas de la columna indicada en el punto 5.3 pueden citarse las siguientes:

6.1. Gas portador: helio de calidad analítica

6.2. Flujo: 2 ml/minuto

6.3. Temperatura del inyector: 250 ºC

6.4. Temperatura del detector: 250 ºC

6.5. Condiciones de temperatura del horno: isotérmica, 180 ºC, tiempo de funcionamiento 10 minutos

6.6. Volumen de inyección: 1 μl, split 1:40

7. **Muestras**

Las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente, protegidas de la luz y del frío.

8. **Procedimiento**

8.1. Examen para confirmar la ausencia de estragol en la muestra

Para asegurarse de que no hay estragol presente de forma natural en la muestra, debe realizarse un análisis en blanco sin adición de patrón interno. En caso de que haya estragol presente de forma natural deberá elegirse otro patrón interno (por ejemplo, mentol).

Pipetear 2 ml de muestra en un matraz aforado de 20 ml, enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

▼M1

8.2. Preparación de las muestras problema

Pipetear 2 ml de muestra en un matraz aforado de 20 ml, añadir 2 ml de solución de patrón interno B (4.5.2), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

8.3. Blanco

Pipetear 2 ml de solución de patrón interno B (4.5.2) en un matraz aforado de 20 ml, enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

8.4. Prueba de linealidad

Antes de iniciar el análisis hay que comprobar la linealidad de la respuesta del DIL, analizando por triplicado sucesivamente cada una de la soluciones de patrón para la prueba de la linealidad (4.5.3).

A partir de las alturas o las áreas de los picos, obtenidas con el integrador, representar gráficamente la concentración de su solución madre en g/l frente al valor R de cada uno.

R = altura o área del pico de trans-anetol dividida por la altura o área del pico de estragol

Debe obtenerse una recta.

8.5. Determinación

Inyectar la solución en blanco (8.3), seguida por la solución de patrón C (4.5.4), y después por uno de los patrones de linealidad (4.5.3) que hará de muestra de control de calidad (este puede elegirse en función de la concentración probable de trans-anetol en la muestra problema), seguido por cinco muestras problema (8.2); introducir una muestra de linealidad (control de calidad) cada cinco muestras problema, para asegurarse de la estabilidad analítica.

9. **Cálculo del factor de respuesta**

Medir las áreas de los picos (utilizando un integrador u otro sistema de datos) o bien las alturas de los picos (integración manual) correspondientes al trans-anetol y al patrón interno.

9.1. Cálculo del factor de respuesta (RF_i)

El factor de respuesta se calcula de la manera siguiente:

RFi = (Ci/área o alturai) * (área o alturais/Cis)

donde:

C_i es la concentración de trans-anetol en la solución de patrón A (4.5.1.)

C_{is} es la concentración de patrón interno en la solución de patrón B (4.5.2.)

$área_i$ es el área (o altura) del pico de trans-anetol

$área_{is}$ es el área (o altura) del pico de patrón interno

RF_i se calcula a partir de 5 muestras de solución C (4.5.4)

9.2. Análisis de las soluciones de la prueba de linealidad de la respuesta

Inyectar las soluciones de la prueba de linealidad de la respuesta (4.5.3).

9.3. Análisis de la muestra

Inyectar la solución de la muestra problema (8.2).

10. **Cálculo de los resultados**

La fórmula para calcular la concentración de trans-anetol es la siguiente:

ci = Cis * (área o alturai/área o alturais) * RFi

donde:

c_i es la concentración de trans-anetol en la muestra problema

C_{is} es la concentración de patrón interno en la muestra problema (4.5.2)

$Área\ o\ altura_i$ es el área (o altura) del pico de trans-anetol

▼M1

Área o altura$_{is}$ es el área (o altura) del pico de patrón interno

RF_i es el coeficiente de respuesta (calculado como se indica en 9.1)

La concentración de trans-anetol se expresa en gramos por litro, con un decimal.

11. **Control y garantía de calidad**

Los cromatogramas deben ser tales que el anetol y el patrón interno estén separados entre sí y de las eventuales sustancias interferentes. El valor RF_i se calcula a partir de los resultados de las cinco inyecciones de solución C (4.5.4). Si el coeficiente de variación [CV % = (desviación típica/media) * 100)] está comprendido entre más o menos 1 %, el valor medio de RF_i es aceptable.

Esta fórmula debe utilizarse para calcular la concentración de trans-anetol en la muestra seleccionada para el control de calidad a partir de las soluciones de control de la linealidad (4.5.3).

Si los resultados medios calculados del análisis de la solución de control de la linealidad seleccionada como muestra de control interno de calidad (CIC) están comprendidos entre más o menos 2,5 % de su valor teórico, pueden aceptarse los resultados obtenidos con las muestras problema.

12. **Tratamiento previo al análisis por CG de las muestras de bebidas espirituosas que contengan grandes cantidades de azúcar y de las muestras de licor**

Extracción de alcohol de una bebida espirituosa que contenga gran cantidad de azúcar, para poder determinar la concentración de trans-anetol mediante cromatografía capilar de gases.

12.1. Principio

Se toma una alícuota de la muestra de licor y se le añade el patrón interno, a una concentración similar a la del analito (trans-anetol) en el licor. También se añade después fosfato de sodio dodecahidratado y sulfato de amonio anhidro. La mezcla resultante se agita y se enfría; se forman dos capas y se retira la capa alcohólica de arriba. Se toma una alícuota de esta capa alcohólica y se diluye con solución de etanol al 45 % (4.4) (Nota: En esta etapa no se añade patrón interno porque ya se ha hecho previamente). La solución resultante se analiza en cromatografía de gases.

12.2. Reactivos y material

Durante la extracción deben utilizarse exclusivamente reactivos de pureza superior al 99 %.

12.2.1. Sulfato de amonio anhidro (CAS 7783-20-2)

12.2.2. Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado (CAS 10039-32-4)

12.3. Aparatos y equipo

Matraces Erlenmeyer, ampollas de decantación, frigorífico.

12.4. Procedimiento

12.4.1. Examen para confirmar la ausencia de estragol en la muestra

Para asegurarse de que no hay estragol presente de forma natural en la muestra, debe realizarse una extracción en blanco (12.6.2) y un análisis sin adición de patrón interno. En caso de que haya estragol presente de forma natural deberá elegirse otro patrón interno.

12.4.2. Extracción

Pipetear 5 ml de etanol al 96 % (4.1) en un matraz Erlenmeyer, pesar en este matraz 50 mg de patrón interno (4.3), y añadir 50 ml de la muestra. Añadir 12 g de sulfato de amonio anhidro (12.2.1), y 8,6 g de fosfato dibásico de sodio dodecahidratado (12.2.2). Tapar el matraz Erlenmeyer.

Agitar el matraz durante al menos 30 minutos. Puede utilizarse un agitador mecánico, pero no una barra de agitador magnético recubierta de teflón, ya que éste puede absorber parte del analito. Obsérvese que las sales añadidas no se disuelven por completo.

Poner el matraz tapado en un frigorífico (T <5 ºC) durante al menos dos horas.

▼M1

Tras este tiempo debe haber dos capas líquidas separadas y un residuo sólido. La capa alcohólica debe estar clara; en caso contrario, volver a poner en el frigorífico hasta obtener una separación clara.

Una vez esté clara la capa alcohólica, tomar cuidadosamente una alícuota (por ejemplo, 10 ml), sin remover la capa acuosa, ponerla en un frasco de vidrio topacio y cerrar firmemente.

12.4.3. Preparación de la muestra extraída para el análisis

Dejar que el extracto (12.4.2) se atempere a temperatura ambiente.

Tomar 2 ml de la capa alcohólica de la muestra extraída atemperada y pasarlos con pipeta a un matraz aforado de 20 ml, enrasar con etanol al 45 % (4.4) y mezclar bien.

12.5. Determinación

Seguir el procedimiento indicado en el punto 8.5.

12.6. Cálculo de los resultados

Aplicar la fórmula siguiente para calcular los resultados:

Ci = (mis/V) * (áreai/áreais) * RFi

donde:

m_{is} es el peso del patrón interno (4.3.) tomado (12.4.2) (en miligramos)

V es el volumen de la muestra problema (50 ml)

RF_i es el factor de respuesta (9.1)

$área_i$ es el área del pico de trans-anetol

$área_{is}$ es el área del pico de patrón interno

Los resultados se expresan en gramos por litro, con un decimal.

12.7. Control y garantía de calidad

Seguir el procedimiento indicado en el punto 11.

13. **Características del método (precisión)**

Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios:

Los cuadros siguientes recogen los valores correspondientes al anetol.

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios	1998
Número de laboratorios	16
Número de muestras	10
Analito	anetol

Pastis:

Muestras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	15	15	15	13	16	16
Número de valores anómalos (laboratorios)	1	1	1	3	—	—
Número de resultados aceptados	30	30	30	26	16	16
Valor medio g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Límite de repetibilidad (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042

▼**M1**

Muestras	A	B	C	D	E	F
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Límite de reproducibilidad (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Tipos de muestras:

A pastis, duplicados ciegos

B pastis, duplicados ciegos

C pastis, duplicados ciegos

D pastis, duplicados ciegos

E pastis, muestra única

F pastis, muestra única

Otras bebidas espirituosas anisadas:

Muestras	G	H	I	J
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	16	14	14	14
Número de valores anómalos (laboratorios)	—	2	1	1
Número de resultados aceptados	32	28	28	28
Valor medio g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Límite de repetibilidad (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Límite de reproducibilidad (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Tipos de muestras:

G ouzo, niveles de fraccionamiento (split) (*)

H anís, duplicados ciegos

I licor anisado, duplicados

J licor anisado, duplicados

▼M1

VI. ÁCIDO GLICIRRÍCICO. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GLICIRRÍCICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

1. **Ámbito de aplicación**

Este método es aplicable a la determinación del ácido glicirrícico en bebidas espirituosas anisadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). El Reglamento (CEE) nº 1576/89 especifica que las bebidas espirituosas anisadas denominadas «pastis» deben presentar un contenido de ácido glicirrícico comprendido entre 0,05 y 0,5 g/l.

2. **Referencias normativas**

ISO 3696: 1987 Agua para uso en laboratorio de análisis — Especificaciones y métodos de prueba.

3. **Principio**

La concentración de ácido glicirrícico se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV. Una solución patrón y la muestra problema se filtran y se inyectan por separado directamente en el sistema de CLAR.

4. **Reactivos y material**

Durante el análisis, utilizar exclusivamente reactivos de grado CLAR, etanol absoluto y agua de grado 3, según se define en la norma ISO 3696.

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

4.2. Glicirricinato de amonio, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (sal amónica del ácido glicirrícico)

(Peso mol.: 839,98) (CAS 53956-04-0): pureza mínima del 90 %.

(Peso mol. del ácido glicirrícico: 822,94)

4.3. Ácido acético glacial, CH_3COOH (CAS 64-19-7)

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

4.5. Etanol al 50 % vol.

Para 1 000 ml a 20 ºC:

— etanol al 96 % vol. (4.1): 521 ml

— agua (2.0): 511 ml

4.6. Preparación de las soluciones de elución de CLAR

4.6.1. Disolvente de elución A (ejemplo)

80 partes (en volumen) de agua (2.0)

20 partes (en volumen) de ácido acético (4.3)

Desgasificar el disolvente de elución durante cinco minutos.

Nota: Si el agua utilizada no se ha microfiltrado, es recomendable filtrar el disolvente de elución preparado a través de un filtro para disolventes orgánicos con un tamaño de poro inferior o igual a 0,45 μm.

4.6.2. Disolvente de elución B

Metanol (4.4).

4.7. Preparación de las soluciones de patrón

Todas las soluciones de patrón deben prepararse de nuevo al cabo de dos meses.

4.7.1. Solución de referencia C

Pesar, con precisión de 0,1 mg, 25 mg de glicirricinato de amonio (4.2) en un matraz aforado de 100 ml. Añadir una porción de etanol al 50 % vol. (4.5) y disolver el glicirricinato de amonio. Una vez disuelto, enrasar con etanol al 50 % (4.5).

Filtrar a través de filtro para disolventes orgánicos.

▼M1

4.7.2. Soluciones de patrón utilizadas para comprobar la linealidad de la respuesta del instrumental

Preparar un solución madre de 1,0 g/l pesando, con precisión de 0,1 mg, 100 mg de glicirricinato de amonio en un matraz aforado de 100 mL. Añadir una porción de etanol al 50 % vol. (4.5) y disolver el glicirricinato de amonio. Una vez disuelto, enrasar con etanol al 50 % (4.5).

Preparar al menos otras cuatro soluciones correspondientes a 0,05, 0,1, 0,25 y 0,5 g/l de glicirricinato de amonio pipeteando respectivamente 5 ml, 10 ml, 25 ml y 50 ml de la solución madre de 1,0 g/l en sendos matraces aforados de 100 ml. Enrasar con etanol al 50 % vol. (4.5) y mezclar bien.

Filtrar todas las soluciones a través de un filtro para disolventes orgánicos.

5. **Aparatos y equipo**

5.1. Sistema de separación

5.1.1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución

5.1.2. Sistema de bombeo que permita conseguir y mantener un flujo constante o programado con gran precisión.

5.1.3. Sistema de detección espectrofotométrico UV que se regule a 254 nm.

5.1.4. Sistema de desgasificación del disolvente

5.2. Registrador o integrador informatizado, de prestaciones compatibles con el resto de los aparatos.

5.3. Columna (ejemplo):

Material: acero inoxidable o vidrio

Diámetro interno: de 4 a 5 mm

Longitud: de 100 a 250 mm

Fase estacionaria: sílice con enlaces cruzados con un grupo funcional octadecilo (C18), preferentemente esférico, con granulometría de 5 μm como máximo.

5.4. Equipo de laboratorio

5.4.1. Balanza analítica con precisión de 0,1 mg

5.4.2. Material aforado de vidrio de clase A

5.4.3. Dispositivo de filtración por micromembrana para pequeños volúmenes

6. **Condiciones cromatográficas**

6.1. Características de elución (ejemplo):

— flujo: 1 ml/minuto,

— disolvente A = 30 %,

— disolvente B = 70 %.

6.2. Detección:

— UV = 254 nm

7. **Procedimiento**

7.1. Preparación de la muestra de licor

Filtrar, si es necesario, a través de filtro para disolventes orgánicos (diámetro de poro: 0,45 μm).

7.2. Determinación

Una vez estabilizadas las condiciones de cromatografía:

— inyectar 20 μl de la solución de referencia C (4.7.1),

— inyectar 20 μl de la solución de muestra,

▼M1

— comparar los dos cromatogramas. Identificar los picos del ácido glicirrícico por su tiempo de retención. Medir sus áreas (o sus alturas) para calcular la concentración en g/l con dos decimales mediante la ecuación siguiente:

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

donde:

c es la concentración en gramos por litro de ácido glicirrícico en la bebida espirituosa analizada

C es la concentración en gramos por litro de glicirricinato de amonio en la solución de referencia

h es el área (o la altura) del pico de ácido glicirrícico de la bebida espirituosa analizada

H es el área (o la altura) del pico de ácido glicirrícico de la solución de referencia

P es la pureza del glicirricinato de amonio de referencia (en %)

823 es la masa molar del ácido glicirrícico

840 es la masa molar del glicirricinato de amonio.

8. **Características del método (precisión)**

Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios:

El cuadro siguiente recoge los valores correspondientes al ácido glicirrícico.

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios	1998
Número de laboratorios	16
Número de muestras	5
Analito	ácido glicirrícico

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	13	14	15	16	16
Número de valores anómalos (laboratorios)	3	2	1	—	—
Número de resultados aceptados	26	28	30	32	32
Valor medio g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Límite de repetibilidad (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Límite de reproducibilidad (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Tipos de muestras:

A pastis, duplicados ciegos

▼**M1**

B pastis, niveles de fraccionamiento (split) (*)

C pastis, duplicados ciegos

D pastis, duplicados ciegos

E pastis, duplicados ciegos

▼M1

VII. CHALCONAS. MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DE CHALCONAS EN PASTIS

1. Ámbito de aplicación

Este método es adecuado para determinar si hay chalconas presentes en bebidas anisadas. Las chalconas son colorantes naturales de la familia de los flavonoides que se encuentran en la raíz de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*).

Para que una bebida espirituosa anisada se denomine «pastis» debe contener chalconas [Reglamento (CEE) nº 1576/89].

2. Referencias normativas

ISO 3696: 1987 Agua para uso en laboratorio de análisis — Especificaciones y métodos de prueba.

3. Principio

Se prepara una solución de extracto de regaliz de referencia. La presencia o ausencia de chalconas se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV.

4. Reactivos y material

Durante el análisis, utilizar exclusivamente reactivos de clase CLAR. El etanol debe ser de 96 % vol. Sólo debe utilizarse agua de grado 3 según la definición de la norma ISO 3696.

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

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

4.3. Sustancia de referencia: *Glycyrrhiza glabra* (regaliz)

Raíces de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) algo trituradas. Dimensiones medias de las partículas alargadas: 10-15 mm de longitud; 1-3 mm de grosor.

4.4. Acetato de sodio, CH_3COONa (CAS 127-09-3)

4.5. Ácido acético glacial, CH_3COOH (CAS 64-19-7)

4.6. Preparación de las soluciones

4.6.1. Etanol al 50 % vol.

Para 1 000 ml a 20 ºC:

— etanol al 96 % vol. (4.1): 521 ml
— agua (2.0): 511 ml

4.6.2. Disolvente A: acetonitrilo

Acetonitrilo (4.2) de pureza analítica CLAR.

Desgasificar

4.6.3. Disolvente B: solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1M, pH 4,66

Pesar 8,203 g de acetato de sodio (4.4), añadir 6,005 g de ácido acético glacial (4.5) y enrasar a 1 000 ml con agua (2) en un matraz aforado.

5. Preparación del extracto de referencia de *glycyrrhiza glabra* (4.3)

5.1. Pesar 10 g de raíz triturada de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) y ponerlos en un matraz de destilación de fondo redondo.

— Añadir 100 ml de etanol al 50 % vol. (4.6.1).
— Tener en ebullición a reflujo durante una hora.
— Filtrar.
— Reservar el filtrado para su uso posterior.

5.2. Recuperar el extracto de regaliz del filtro

— Poner en un matraz de destilación de fondo redondo.
— Añadir 100 ml de etanol al 50 % vol. (4.6.1).
— Tener en ebullición a reflujo durante una hora.

▼M1

— Filtrar. Reservar el filtrado para su uso posterior.

5.3. La extracción de raíz de regaliz debe realizarse tres veces sucesivamente.

5.4. Reunir los tres filtrados.

5.5. Evaporar la fase de disolvente (de 5.4) en un evaporador giratorio.

5.6. Recoger el extracto residual (de 5.5) con 100 ml de etanol al 50 % vol. (4.6.1).

6. **Aparatos y equipo**

6.1. Sistema de separación

6.1.1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución

6.1.2. Sistema de bombeo que permita conseguir y mantener un flujo constante o programado a presión elevada.

6.1.3. Sistema de detección espectrofotométrico UV/visible que pueda regularse a 254 y 370 nm.

6.1.4. Sistema de desgasificación del disolvente

6.1.5. Estufa de columna que pueda regularse a la temperatura de 40 ± 0,1 ºC.

6.2. Registrador o integrador informatizado, de prestaciones compatibles con el resto del sistema de separación.

6.3. Columna

Material: acero inoxidable o vidrio

Diámetro interno: de 4 a 5 mm

Fase estacionaria: sílice con enlaces cruzados con un grupo funcional derivado del octadecilo (C18), con granulometría de 5 µm como máximo (fase de enlaces cruzados).

6.4. Material corriente de laboratorio, incluido el siguiente:

6.4.1. Balanza analítica (precisión: ± 0,1 mg).

6.4.2. Aparato de destilación con condensador de reflujo con, por ejemplo, los siguientes elementos:

— un matraz de fondo redondo de 250 ml con cuello esmerilado normalizado,

— un condensador de reflujo de 30 cm de longitud, y

— una fuente de calor (debe evitarse toda reacción pirógena que afecte al material extractivo, mediante el uso de un dispositivo adecuado).

6.4.3. Aparato de evaporación giratorio.

6.4.4. Dispositivo de filtración (por ejemplo, embudo Buchner)

6.5. Condiciones de cromatografía (ejemplo)

6.5.1. Características de elución de los disolventes A (4.6.2) y B (4.6.3):

— pasar de 20/80 (v/v) a 50/50 (v/v) uniformemente a lo largo de quince minutos,

— pasar de 50/50 (v/v) a 75/25 (v/v) uniformemente a lo largo de cinco minutos,

— mantener la composición en 75/25 (v/v) durante cinco minutos,

— estabilización de la columna entre inyecciones,

— mantener la composición en 20/80 (v/v) durante cinco minutos.

6.5.2. Flujo: 1 ml/minuto

6.5.3. Regulación del detector de UV:

El detector debe regularse a 370 nm para detectar la presencia de chalconas y después a 254 nm para detectar el ácido glicirrícico.

Nota: El cambio de longitud de onda (de 370 nm a 254 nm) debe realizarse 30 segundos antes del inicio del pico de elución del ácido glicirrícico.

▼M1

7. **Procedimiento**

7.1. Preparación de la muestra de licor

Filtrar a través de filtro para disolventes orgánicos (diámetro de poro: 0,45 μm).

7.2. Preparación del extracto residual de regaliz (5.6)

Hacer una dilución 1:10 con etanol al 50 % vol. (4.6.1) antes del análisis.

7.3. Determinación

7.3.1. Inyectar 20 μl del extracto preparado de regaliz (7.2). Efectuar el análisis utilizando las condiciones de cromatografía descritas anteriormente (6.5).

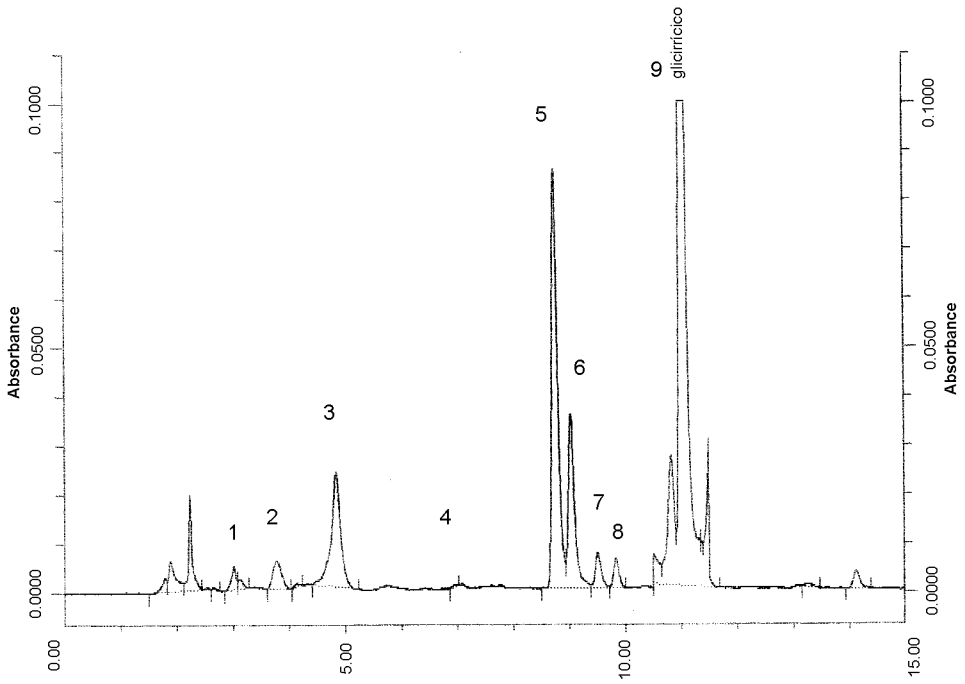
7.3.2. Inyectar 20 μl de la muestra (7.1) (muestra de bebida espirituosa anisada). Efectuar el análisis utilizando las condiciones de cromatografía descritas anteriormente (6.5).

7.3.3. Comparar los dos cromatogramas. Debe observarse una gran similitud entre los dos cromatogramas en la zona de salida de la chalcona (durante la detección a 370 nm en las condiciones analíticas descritas anteriormente) (véase la figura 1).

8. **Cromatograma característico de un pastis**

Figura 1

Cromatograma obtenido mediante el método descrito anteriormente y que muestra la presencia de chalconas en un pastis. Los picos 1 a 8 son de chalconas y el pico 9 es de ácido glicirrícico.



9. **Características del método (precisión)**

Resultados del estudio interlaboratorios:

El cuadro siguiente recoge las características de reconocimiento de la presencia o ausencia de chalconas en pastis y bebidas espirituosas anisadas.

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios	1998
Número de laboratorios	14

▼**M1**

Número de muestras	11
Analitos	chalconas

Muestras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	14	14	14	14	14	13
Número de valores anómalos (laboratorios)	—	—	—	—	—	1 (*)
Número de resultados aceptados	28	14	14	28	28	26
Número de resultados de presencia de chalconas	28	14	14	0	28	0
Número de resultados de ausencia de chalconas	0	0	0	28	0	26
Porcentaje de resultados correctos (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Resultados incoherentes entre los dos duplicados, atribuidos a un error de muestreo.

Muestras	G	H	I	J	K
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	14	14	14	14	14
Número de valores anómalos (laboratorios)	—	—	—	—	—
Número de resultados aceptados	28	14	14	28	28
Número de resultados de presencia de chalconas	0	0	0	0	0
Número de resultados de ausencia de chalconas	28	14	14	28	28
Porcentaje de resultados correctos (%)	100	100	100	100	100

Tipos de muestras:

A pastis, duplicados ciegos

B pastis, muestra única

C pastis, muestra única

D «pastis» (sin chalconas), duplicados ciegos

E «pastis» (sin chalconas), duplicados ciegos

F licor anisado (sin chalconas), duplicados ciegos

G licor anisado (sin chalconas), duplicados ciegos

H ouzo (sin chalconas), muestra única

I ouzo (sin chalconas), muestra única

J anís (sin chalconas), duplicados ciegos

K «pastis» (sin chalconas), duplicados ciegos

▼M1

IX. YEMA DE HUEVO. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE YEMA DE HUEVO EN LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS — MÉTODO FOTOMÉTRICO

1. Ámbito de aplicación

Este método es adecuado para la determinación de la concentración de yema de huevo en la gama de 40-250 g/l en licores de huevo y en licores a base de huevo.

2. Referencias normativas

ISO 3696: 1987 Agua para uso en laboratorio de análisis — Especificaciones y métodos de prueba.

3. Principio

Los compuestos fosforados solubles en etanol que se encuentran en la yema de huevo se extraen y se estudian por fotometría en forma de complejo de molibdato de fósforo.

4. Reactivos y material

4.1. Agua bidestilada

4.2. Tierra de diatomeas

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

4.4. Solución de acetato de magnesio al 15 % (CAS 16674-78-5)

4.5. Ácido sulfúrico al 10 % (CAS 7664-93-9)

4.6. Ácido sulfúrico 1 N

4.7. Solución de fosfato diácido de potasio, KH_2PO_4, de 0,16 g/l (CAS 778-77-0)

4.8. Reactivo para la determinación de fosfatos:

Disolver 20 g de molibdato de amonio (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ en 400 ml de agua a 50 ºC.

Disolver, en otro recipiente, 1 g de vanadato de amonio (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3, en 300 ml de agua caliente, dejar enfriar y añadir después 140 ml de ácido nítrico concentrado (CAS 7697-37-2). Reunir las soluciones enfriadas en un matraz aforado de 1 000 ml y enrasar.

5. Aparatos y equipo

5.1. Matraz Erlenmeyer de 100 ml

5.2. Baño de ultrasonidos (o agitador magnético)

5.3. Matraz aforado de 100 ml

5.4. Baño María a 20 ºC

5.5. Filtro (Whatman nº 4 o equivalente)

5.6. Crisol de porcelana (o platino)

5.7. Baño María en ebullición

5.8. Placa de calefacción

5.9. Horno de mufla

5.10. Matraz aforado de 50 ml

5.11. Matraz aforado de 20 ml

5.12. Espectrofotómetro regulado a 420 nm

5.13. Cubeta de 1 cm.

6. Muestras

Antes del análisis, las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente.

▼M1

7. **Procedimiento**

7.1. Preparación de la muestra

7.1.1. Pesar 10 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 100 ml (5.1).

7.1.2. Añadir gradualmente 70 ml de etanol (4.3) en pequeñas porciones, agitando por rotación tras cada adición, y poner en baño de ultrasonidos (5.2) durante quince minutos [o agitar la mezcla con un agitador magnético (5.2) durante diez minutos a temperatura ambiente].

7.1.3. Pasar el contenido del matraz a un matraz aforado de 100 ml (5.3) lavando con etanol (4.3). Enrasar con etanol (4.3) y poner los matraces en el baño María a 20 ºC (5.4). Enrasar a 20 ºC.

7.1.4. Añadir una pequeña cantidad de tierra de diatomeas (4.2) y filtrar (5.5), desechando los primeros 20 ml.

7.1.5. Pasar 25 ml del filtrado a un crisol de porcelana (o platino) (5.6). Concentrar el filtrado evaporando delicadamente en un baño María en ebullición (5.7), con adición de 5 ml de solución de acetato de magnesio al 15 % (4.4).

7.1.6. Poner los crisoles en una placa de calefacción (5.8) y calentar justo hasta sequedad.

7.1.7. Incinerar el residuo calentando a incandescencia a 600 ºC en un horno mufla (5.9) hasta que la ceniza sea blanca; el tiempo de calentamiento mínimo es de una hora y media, pero puede calentarse toda una noche.

7.1.8. Recoger la ceniza con 10 ml de ácido sulfúrico al 10 % (4.5), pasarla, lavando con agua destilada (4.1) a un matraz aforado de 50 ml (5.10) y enrasar a temperatura ambiente con agua destilada (4.1). Debe utilizarse una alícuota de 5 ml de esta solución de cenizas a fin de preparar la solución de muestra para la determinación fotométrica del fosfato.

7.2. Determinación fotométrica del fosfato

7.2.1. Solución de contraste

7.2.1.1. Poner 10 ml de ácido sulfúrico al 10 % (4.5) en un matraz aforado de 50 ml (5.10) y enrasar con agua destilada (4.1).

7.2.1.2. A una alícuota de 5 ml de esta solución (7.2.1.1), puesta en un matraz aforado de 20 ml (5.11), añadir 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) y 2 ml del reactivo de fosfato (4.8), y enrasar con agua destilada (4.1).

7.2.1.3. Tapar con tapón poco ajustado, agitar y calentar en baño María en ebullición (5.7) durante diez minutos; enfriar a continuación en baño María a 20 ºC (5.4) durante veinte minutos.

7.2.1.4. Llenar una cubeta de 1 cm (5.13) con esta solución de contraste.

7.2.2. Solución de muestra

7.2.2.1. A una alícuota de 5 ml de la solución de cenizas (7.1.8), puesta en un matraz aforado de 20 ml (5.11), añadir 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) y 2 ml del reactivo de fosfato (4.8), y enrasar con agua destilada (4.1).

7.2.2.2. Tapar con tapón poco ajustado, agitar y calentar en baño María en ebullición (5.7) durante diez minutos; enfriar a continuación en baño María a 20 ºC (5.4) durante veinte minutos.

7.2.2.3. La solución amarilla que se forma se analiza inmediatamente por espectrofotometría (5.12) en una cubeta de 1 cm (5.13) a 420 nm frente a la solución de contraste (7.2.1.4).

7.2.3. Curva de calibración

7.2.3.1. Para construir la curva de calibración, añadir alícuotas de 2 ml del reactivo de fosfato (4.8) a una serie de matraces aforados de 20 ml (5.11), de los que cada uno contiene 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) y 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ml de solución de fosfato diácido de potasio (4.7), respectivamente, y enrasar con agua destilada (4.1).

7.2.3.2. Tapar con tapón poco ajustado, agitar y calentar en baño María en ebullición (5.7) durante diez minutos; enfriar a continuación en baño María a 20 ºC (5.4) durante veinte minutos. Analizar por espectrofotometría (5.12) en cubeta de 1 cm (5.13) a 420 nm frente a la solución de contraste (7.2.1.4).

▼**M1**

7.2.3.3. Construcción de la curva de calibración:

Solución de fosfato diácido (mL)	0	2	4	6	8	10
P_2O_5 (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. **Expresión de los resultados**

El contenido de yema de huevo en g/l se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{g/l yema de huevo} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{densidad}}{E/40}$$

donde:

110	es el factor de conversión correspondiente al P_2O_5 total en g por 100 g de yema de huevo
mg P_2O_5	es el valor establecido a partir de la curva de calibración
densidad	es la masa por unidad de volumen (g/ml) del licor a base de huevo a 20 ºC
E	es el peso del licor a base de huevo en g
40	es el factor de dilución correspondiente a una alícuota de 5 ml de solución de cenizas.

9. **Características del método (precisión)**

Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios:

El cuadro siguiente recoge los valores correspondientes a la yema de huevo.

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios	1998
Número de laboratorios	24
Número de muestras	5
Analito:	Yema de huevo

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	19	20	22	20	22
Número de valores anómalos (laboratorios)	3	4	2	4	2
Número de resultados aceptados	38	40	44	40	44
Valor medio	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Límite de repetibilidad (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Límite de reproducibilidad (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

▼**M1**

Tipos de muestras:

A Advocaat, duplicados ciegos

B Advocaat, duplicados ciegos

C Advocaat, duplicados ciegos

D Advocaat (diluido), niveles de fraccionamiento (split) (*)

E Advocaat, duplicados ciegos