Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

►**B** **REGOLAMENTO (CE) N. 2870/2000 DELLA COMMISSIONE**

del 19 dicembre 2000

che definisce i metodi d'analisi comunitari di riferimento applicabili nel settore delle bevande spiritose

(GU L 333 del 29.12.2000, pag. 20)

Modificato da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
►**M1**	Regolamento (CE) n. 2091/2002 della Commissione del 26 novembre 2002	L 322	11	27.11.2002

Rettificato da:

►**C1** Rettifica, GU L 322 del 27.11.2002, pag. 55 (2870/2000)

▼B

REGOLAMENTO (CE) N. 2870/2000 DELLA COMMISSIONE

del 19 dicembre 2000

che definisce i metodi d'analisi comunitari di riferimento applicabili nel settore delle bevande spiritose

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CEE) n. 1576/89 del Consiglio, del 29 maggio 1989, che stabilisce le regole generali relative alla definizione, alla designazione e alla presentazione delle bevande spiritose ([1]), modificato dall'atto di adesione dell'Austria, della Finlandia e della Svezia, in particolare l'articolo 4, paragrafo 8,

considerando quanto segue:

(1) L'articolo 4, paragrafo 8, del regolamento (CEE) n. 1576/89 prevede la definizione dei metodi da utilizzare per analizzare le bevande spiritose. Bisogna ricorrere a metodi di riferimento per garantire il rispetto del regolamento (CEE) n. 1576/89 e del regolamento (CEE) n. 1014/90 della Commissione, del 24 aprile 1990, recante modalità d'applicazione per la definizione, la designazione e la presentazione delle bevande spiritose ([2]), modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 2140/98 ([3]), nei controlli ufficiali e in caso di controversia.

(2) È opportuno definire descrivendoli, per quanto possibile, come metodi di riferimento comunitari per le analisi quelli generalmente riconosciuti.

(3) Per tenere conto del progresso scientifico e delle differenti attrezzature dei laboratori ufficiali è opportuno consentire, sotto la responsabilità del direttore del laboratorio interessato, l'applicazione di metodi di analisi basati su principi di misurazione differenti da quelli di riferimento descritti nell'allegato del presente regolamento, qualora tali metodi offrano sufficienti garanzie per i risultati e soddisfino in particolare ai criteri stabiliti nella direttiva 85/591/CEE del Consiglio, del 20 dicembre 1985, concernente l'istituzione di modalità di prelievo dei campioni e di metodi d'analisi comunitari per il controllo dei prodotti destinati all'alimentazione umana ([4]) e si possa dimostrare che l'accuratezza, la ripetibilità e la riproducibilità dei relativi risultati variano entro i limiti di quelli ottenuti con i metodi di riferimento descritti nel presente regolamento. Qualora tale condizione sia soddisfatta, è opportuno consentire l'applicazione di altri metodi di analisi. Occorre tuttavia precisare che, in caso di controversia, tali altri metodi non possono sostituire quelli di riferimento.

(4) Le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di applicazione per le bevande spiritose,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

I metodi d'analisi comunitari di riferimento applicabili nel settore delle bevande spiritose, che consentono di verificare se sono rispettate le disposizioni previste dal regolamento (CEE) n. 1576/89 e dal regolamento (CEE) n. 1014/90:

— nei controlli ufficiali, o

— in caso di controversia,

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

▼B

sono quelli indicati nell'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

In deroga all'articolo 1, primo trattino, e sotto la responsabilità del direttore del laboratorio interessato, sono ammessi altri metodi d'analisi a condizione che l'accuratezza e la precisione (ripetibilità e riproducibilità) di questi metodi siano almeno equivalenti a quelli dei metodi d'analisi di riferimento corrispondenti, di cui all'allegato.

Articolo 3

Qualora non siano previsti metodi d'analisi comunitari di riferimento ai fini della rilevazione e della quantificazione delle sostanze contenute in una bevanda spiritosa, sono applicabili:

a) metodi d'analisi convalidati secondo procedure riconosciute a livello internazionale e che soddisfano, in particolare, ai criteri di cui all'allegato della direttiva 85/591/CEE oppure

b) metodi d'analisi conformi alle norme raccomandate dall'ISO (International Organization for Standardization, Organizzazione internazionale per la standardizzazione) oppure

c) metodi di analisi riconosciuti dall'assemblea generale dell'OIV (Office international de la vigne et du vin, Ufficio internazionale della vite e del vino) e da esso pubblicati oppure

d) qualora non siano disponibili i metodi di cui alle lettere a), b) e c) e in base alla sua accuratezza, alla sua ripetibilità e alla sua riproducibilità,

   — un metodo d'analisi ammesso dallo Stato membro interessato,

   — qualsiasi altro metodo d'analisi appropriato, qualora necessario.

Articolo 4

Ai fini dell'applicazione del presente regolamento:

a) per limite di ripetibilità si intende il valore al di sotto del quale si situa, o a cui equivale, con una probabilità del 95 %, il valore assoluto della differenza tra i due singoli risultati ottenuti da misurazioni effettuate in condizioni di ripetibilità (stesso operatore, stessa apparecchiatura, stesso laboratorio e un breve intervallo di tempo tra le due misurazioni) {ISO 3534-1};

b) per limite di riproducibilità si intende il valore al di sotto del quale si situa, o a cui equivale, con una probabilità del 95 %, il valore assoluto della differenza tra i due singoli risultati ottenuti da misurazioni effettuate in condizioni di riproducibilità (operatori differenti, apparecchiature differenti e laboratori differenti) {ISO 3534-1};

c) per accuratezza si intende la prossimità del valore di un risultato ottenuto al valore di riferimento riconosciuto {ISO 3534-1}.

Articolo 5

Il presente regolamento entra in vigore il settimo giorno successivo a quello della sua pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Esso è applicabile dal 1º gennaio 2001.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

▼**B**

ALLEGATO

DESCRIZIONE DEI METODI D'ANALISI DI RIFERIMENTO PER:

I. Determinazione del titolo alcolometrico volumico

Appendice I: Preparazione del distillato

Appendice II: Misurazione della massa volumica del distillato

— Metodo A = picnometria

— Metodo B = densimetria elettronica

— Metodo C = densimetria con bilancia idrostatica

II. Determinazione dell'estratto secco totale (metodo gravimetrico)

III. Determinazione di sostanze volatili e metanolo

III.1. Osservazioni generali

III.2. Composti volatili: aldeidi, alcoli superiori, acetato d'etile e metanolo (gascromatografia)

III.3. Acidità volatile (p. m.)

IV. Acido cianidrico (p. m.)

V. Anetolo ►**M1** ——— ◄

VI. Acido glicirrizico ►**M1** ——— ◄

VII. Calconi ►**M1** ——— ◄

VIII. Zuccheri (p. m.)

IX. Giallo d'uovo ►**M1** ——— ◄

▼B

I. DETERMINAZIONE DEL TITOLO ALCOLOMETRICO VOLUMICO DELLE BEVANDE SPIRITOSE

Introduzione

Il metodo di riferimento è illustrato nelle due seguenti appendici:

Appendice I: Preparazione del distillato

Appendice II: Misurazione della massa volumica del distillato

1. **Campo d'applicazione**

Il metodo è adatto per la determinazione del titolo alcolometrico volumico effettivo delle bevande spiritose.

2. **Riferimenti normativi**

ISO 3696:1987: Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova.

3. **Termini e definizioni**

3.1. *Temperatura di riferimento:*

La temperatura di riferimento è fissata a 20 ºC per la determinazione del titolo alcolometrico volumico effettivo, della massa volumica e della densità relativa delle bevande spiritose.

Nota 1: L'espressione «a t ºC» sarà riservata a determinazioni (di massa volumica o di titolo alcolometrico volumico effettivo) espresse a una temperatura differente dalla temperatura di riferimento (20 ºC).

3.2. *Massa volumica:*

La massa volumica è il quoziente della massa di un certo volume nel vuoto di bevande spiritose a 20 ºC divisa per tale volume. Viene espressa in chilogrammi per metro cubo e il suo simbolo è $\rho_{20\ ^\circ C}$ oppure ρ_{20}.

3.3. *Densità relativa:*

La densità relativa è il rapporto, espresso in numero decimale, tra la massa volumica della bevanda spiritosa a 20 ºC e la massa volumica dell'acqua alla stessa temperatura. Il suo simbolo è $d_{20\ ^\circ C/20\ ^\circ C}$ oppure $d_{20/20}$, o semplicemente d, quando non sia possibile alcuna confusione. Sui certificati d'analisi, vanno utilizzati unicamente i simboli definiti sopra.

Nota 2: È possibile ottenere la densità volumica relativa dalla massa volumica p_{20} a 20 ºC:

ρ_{20} = 998,203 x $d_{20/20}$ oppure $d_{20/20} = \rho_{20}/998{,}203$, dove 998,203 è la massa volumica dell'acqua a 20 ºC.

3.4. *Titolo alcolometrico volumico effettivo*

Il titolo alcolometrico volumico effettivo delle bevande spiritose è uguale al numero di litri di alcole etilico contenuti in 100 litri di miscela idroalcolica avente la stessa massa volumica della bevanda spiritosa dopo distillazione. I valori di riferimento da utilizzare per il titolo alcolometrico volumico (% vol) a 20 ºC in funzione della massa volumica a 20 ºC delle miscele idroalcoliche sono quelli che figurano nella tabella internazionale adottata dall'Organizzazione Internazionale di Metrologia Legale nella sua raccomandazione n. 22.

La formula generale che pone in relazione il titolo alcolometrico volumico e la massa volumica delle miscele idroalcoliche in funzione della temperatura è riportata nell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 della Commissione, capitolo 3 («Titolo alcolometrico volumico»), pag. 40 (GU L 272 del 3.10.1990, pag. 1), o nella raccolta dei metodi d'analisi dell'OIV (1994), (pag. 17).

Nota 3: Nel caso di liquori o creme, di cui è molto difficile misurare un volume esatto, occorre pesare il campione e calcolare dapprima il titolo alcolometrico massico.

▼B

Formula di conversione:

$$\text{titolo alcolometrico volumico (\% vol.)} = \frac{\text{ASM (\% massa)} \times \rho_{20}\text{ (campione)}}{\rho_{20}\text{ (alcole)}}$$

dove ASM = titolo alcolometrico massico,

ρ_{20} (alcole) = 789,24 kg/m^3

4. **Principio**

Dopo la distillazione, il titolo alcolometrico volumico del distillato viene determinato per picnometria, densimetria elettronica o densimetria con bilancia idrostatica.

▼B

APPENDICE I: PREPARAZIONE DEL DISTILLATO

1. **Campo d'applicazione**

Il metodo è adatto per la preparazione di distillati da utilizzare per la determinazione del titolo alcolometrico volumico effettivo delle bevande spiritose.

2. **Principio**

Le bevande spiritose vengono distillate per separare le «materie estrattive» (sostanze che non distillano) dall'alcole etilico e da altri prodotti volatili.

3. **Reagenti e materiali**

3.1. Granuli per regolare l'ebollizione.

3.2. Emulsione antischiuma concentrata (per liquori-creme).

4. **Apparecchiatura e materiale**

Comune dotazione di laboratorio e in particolare i seguenti elementi:

4.1. Bagno criotermostatico regolabile a temperature comprese tra 10 e 15 ºC.

Bagno criotermostatico regolabile a 20 ºC (± 0,2 ºC).

4.2. Matracci tarati classe A da 100 e 200 ml, certificati a ± 0,1 e 0,15 %, rispettivamente.

4.3. Apparecchiatura da distillazione:

4.3.1. Requisiti generali

L'apparecchio da distillazione deve presentare le seguenti caratteristiche:

— un numero di connessioni limitato allo stretto indispensabile per assicurare la tenuta del sistema,

— un dispositivo atto ad impedire il trascinamento del liquido in ebollizione da parte dei vapori) e a regolare la velocità di distillazione dei vapori ricchi di alcole,

— condensazione rapida e totale dei vapori alcolici,

— raccolta delle prime frazioni di distillazione in mezzo acquoso.

La fonte di calore utilizzata deve permettere, mediante un dispositivo appropriato di diffusione del calore, di evitare la pirolisi delle materie estrattive.

4.3.2. L'apparecchio di distillazione presentato a fine di esempio nella figura 1 è costituito da:

— un pallone della capacità di un litro, con raccordo sferico standardizzato,

— una colonna di rettifica dell'altezza minima di 20 cm (per esempio, tipo Vigreux),

— un tubo di raccordo a gomiti dotato, nella parte diritta finale, di un refrigerante a bordi dritti (refrigerante di West) della lunghezza di circa 10 cm,

— un refrigerante a serpentina della lunghezza di 40 cm,

— un tubo rastremato che permette di portare il distillato al fondo del matraccio tarato di ricevimento contenente un piccolo volume d'acqua.

Nota: L'apparecchio descritto sopra è previsto per un campione di almeno 200 ml. Esso può essere comunque adattato ad un campione di volume minore, utilizzando un pallone da distillazione più piccolo, purché si ricorra a una bolla paraspruzzi o a qualche altro strumento per impedire il trascinamento.

5. **Conservazione del campione per l'analisi**

Prima dell'analisi, conservare i campioni a temperatura ambiente.

6. **Modo di operare**

Osservazione preliminare:

La distillazione può essere effettuata anche secondo la procedura descritta dall'IUPAC (1968).

▼B

6.1. Verifica dell'apparecchio di distillazione.

L'apparecchio utilizzato deve soddisfare ai seguenti requisiti:

La distillazione di 200 ml di soluzione idroalcolica, con titolo noto prossimo al 50 % vol. non deve produrre una perdita di alcole superiore allo 0,1 % vol.

6.2. Bevande spiritose con titolo alcolometrico inferiore al 50 % vol.

Misurare 200 ml di bevanda spiritosa in un matraccio tarato.

Registrare la temperatura di questo liquido o mantenerlo a temperatura standard (20 ºC).

Versare il campione nel pallone dell'apparecchio per distillazione e risciacquare il matraccio tarato con tre aliquote di circa 20 ml di acqua distillata; aggiungere ogni aliquota di liquido di risciacquo al contenuto del pallone di distillazione.

Nota: Questa diluizione di 60 ml è sufficiente nel caso di bevande spiritose contenenti meno di 250 g di estratto secco/l; in caso contrario, per evitare la pirolisi occorre che il volume dei liquidi di risciacquo sia almeno di 70 ml se l'estratto secco è di 300 g/l, 85 ml per un estratto secco di 400 g/l e 100 ml per un estratto secco di 500 g/l (liquori o creme di frutti); adeguare tali volumi proporzionalmente ai vari volumi del campione.

Aggiungere alcuni granuli per regolare l'ebollizione (3.1) (ed emulsione antischiuma per liquori-creme).

Versare 20 ml di acqua distillata nel matraccio originario di 200 ml che verrà usato per la raccolta del distillato. Questo matraccio viene successivamente posto in un bagno di acqua fredda (4.1) (10-15 ºC per bevande spiritose all'anice).

Distillare, evitando trascinamenti e carbonizzazioni, agitando di quando in quando il contenuto del pallone da distillazione fino a quando il distillato arriverà ad un livello inferiore di qualche millimetro alla tacca di riferimento.

Dopo aver portato questo distillato ad una temperatura identica a quella iniziale, con l'approssimazione di ± 0,5 ºC, portare a volume con acqua distillata e miscelare accuratamente.

Questo distillato è utilizzato per determinare il titolo alcolometrico volumico (appendice II).

6.3. Bevande spiritose con titolo alcolometrico superiore al 50 % vol.

Misurare 100 ml di bevanda spiritosa in un matraccio tarato da 100 ml e versarli nel pallone dell'apparecchio da distillazione.

Risciacquare più volte il matraccio tarato con acqua distillata aggiungendo i liquidi di risciacquo al contenuto del pallone da distillazione. Utilizzare una quantità d'acqua sufficiente affinché il contenuto del pallone arrivi a circa 230 ml.

Versare 20 ml di acqua distillata in un matraccio da 200 ml che verrà usato per la raccolta del distillato. Questo matraccio viene successivamente posto in un bagno di acqua fredda (4.1) (10-15 ºC per bevande spiritose all'anice).

Distillare, agitando di quando in quando il pallone da distillazione, fino a quando il distillato arriverà ad un livello inferiore di qualche millimetro alla tacca di riferimento di 200 ml.

Dopo aver portato questo distillato ad una temperatura identica a quella iniziale, con l'approssimazione di ± 0,5 ºC, portare a volume con acqua distillata e miscelare accuratamente.

Questo distillato è utilizzato per determinare il titolo alcolometrico volumico (appendice II).

Nota: Il titolo alcolometrico volumico della bevanda spiritosa è il doppio del titolo alcolometrico del distillato.

▼B

APPENDICE II: MISURAZIONE DELLA MASSA VOLUMICA DEL DISTILLATO

METODO A: DETERMINAZIONE DEL TITOLO ALCOLOMETRICO VOLUMICO EFFETTIVO DELLE BEVANDE SPIRITOSE — MISURAZIONE PER PICNOMETRIA

A.1. **Principio**

Il titolo alcolometrico volumico è ottenuto dalla massa volumica del distillato misurata per picnometria.

A.2. **Reagenti e materiali**

Tranne se altrimenti prescritto, utilizzare soltanto reagenti di qualità analitica riconosciuta e acqua almeno di classe 3, quali definiti in ISO 3696:1987.

A.2.1. Soluzione di cloruro di sodio (2 % m/v)

Per preparare un litro di soluzione, pesare 20 g di cloruro di sodio e scioglierli in un litro d'acqua.

A.3. **Apparecchiatura e materiale**

Comune dotazione di laboratorio e in particolare i seguenti elementi:

A.3.1. Bilancia analitica con precisione di 0,1 mg.

A.3.2. Termometro, con raccordo smerigliato, graduato in decimi di grado da 10 a 30 ºC; il termometro dev'essere certificato o verificato mediante un termometro certificato.

A.3.3. Picnometro in vetro pyrex da circa 100 ml provvisto di un termometro mobile con raccordo smerigliato (A.3.2); il picnometro porta un tubo laterale di 25 mm di lunghezza e di 1 mm al massimo di diametro interno, con terminazione conica smerigliata; possono essere usati, se del caso, altri picnometri descritti in ISO 3507, ad esempio da 50 ml.

A.3.4. Pallone tara avente lo stesso volume esterno del picnometro (a meno di circa 1 ml) e di massa uguale alla massa del picnometro pieno di un liquido di densità 1,01 (soluzione di cloruro di sodio: cfr. A.2.1).

A.3.5. Involucro coibentato che si adatta perfettamente al corpo del picnometro.

Nota 1: Il metodo di riferimento per la determinazione della massa volumica nel vuoto delle bevande spiritose prevede l'uso di una bilancia a due piatti e di un picnometro e del suo pallone tara di uguale volume esterno per annullare in ogni istante la spinta dell'aria. Questa semplice tecnica può venire applicata con una bilancia monopiatto pesando anche il pallone tara per seguire le variazioni della spinta dell'aria nel tempo.

A.4. **Modo di operare**

Osservazioni preliminari:

Il modo di operare qui descritto si riferisce all'utilizzazione di un picnometro da 100 ml per la determinazione del titolo alcolometrico, strumento questo che fornisce la migliore precisione; è tuttavia possibile utilizzare un picnometro di volume inferiore (ad esempio da 50 ml).

A.4.1. Taratura del picnometro

La taratura del picnometro comporta la determinazione delle seguenti caratteristiche:

— tara a vuoto,
— volume a 20 ºC,
— massa del picnometro pieno d'acqua a 20 ºC.

A.4.1.1. Taratura mediante bilancia monopiatto:

Determinare:

— la massa del picnometro asciutto e pulito (P),
— la massa del picnometro pieno d'acqua, a t ºC (P1),
— la massa del pallone tara (T0).

▼B

A.4.1.1.1. Pesare il picnometro pulito e asciutto (P).

A.4.1.1.2. Riempire con cura il picnometro con acqua distillata a temperatura ambiente ed immergere il termometro.

Asciugare con cura il picnometro e collocarlo nell'involucro coibentato; agitare capovolgendo il contenitore finché la temperatura letta al termometro sia costante.

Portare il livello del picnometro esattamente al bordo superiore del tubo laterale. Leggere la temperatura t ºC con accuratezza ed effettuare l'eventuale correzione della scala del termometro.

Pesare il picnometro pieno d'acqua (P1).

A.4.1.1.3. Pesare il pallone tara (T0).

A.4.1.1.4. Calcolo

— Tara del picnometro vuoto = P – m

dove m è la massa d'aria contenuta nel picnometro.

m = 0,0012 × (P1 – P)

Nota 2: 0,0012 è la massa volumica dell'aria secca a 20 ºC ad una pressione di 760 mm di mercurio.

— Volume del picnometro a 20 ºC:

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

dove Ft è il fattore ricavato dalla tabella I del capitolo 1 («Massa volumica a 20 ºC e densità relativa a 20 ºC») dell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 (pag. 10), per la temperatura t ºC.

$V_{20\,°C}$ deve essere noto con l'approssimazione di ± 0,001 ml.

— Massa d'acqua nel picnometro a 20 ºC:

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ dove 0,998203 è la massa volumica dell'acqua a 20 ºC.

Nota 3: Se necessario, può essere utilizzato il valore 0,99715 della massa volumica nell'aria e si può calcolare il titolo alcolometrico in riferimento alla massa volumica corrispondente delle tabelle «in aria» utilizzato dai servizi delle «Dogane e accise di Sua Maestà la Regina del Regno Unito».

A.4.1.2. Metodo di taratura mediante bilancia a due piatti:

A.4.1.2.1. Una volta collocato il pallone tara sul piatto sinistro della bilancia ed il picnometro pulito e asciutto munito del relativo «tappo ricevitore» sul piatto destro, raggiungere l'equilibrio ponendo accanto al picnometro le masse opportune: p grammi.

A.4.1.2.2. Riempire con cura il picnometro con acqua distillata a temperatura ambiente ed immergere il termometro; asciugare con cura il picnometro e collocarlo nell'involucro coibentato; agitare capovolgendo il contenitore finché la temperatura letta al termometro sia costante.

Portare il livello del picnometro esattamente al bordo superiore del tubo laterale. Asciugare questo tubo ed applicare il «tappo ricevitore»; leggere la temperatura t ºC con accuratezza ed effettuare l'eventuale correzione della scala del termometro.

Pesare il picnometro pieno d'acqua: sia p' la massa in grammi che realizza l'equilibrio.

A.4.1.2.3. Calcolo

— Tara del picnometro vuoto = p + m

dove m è la massa d'aria contenuta nel picnometro.

m = 0,0012 × (p – p')

— Volume del picnometro a 20 ºC:

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

dove F_t è il fattore ricavato dalla tabella I del capitolo 1 («Massa volumica a 20 ºC e densità relativa a 20 ºC») dell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 (pag. 10), per la temperatura t ºC.

$V_{20\,°C}$ deve essere noto con l'approssimazione di ± 0,001 ml.

— Massa d'acqua nel picnometro a 20 ºC:

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

dove 0,998203 è la massa volumica dell'acqua a 20 ºC.

▼B

A.4.2. Determinazione del titolo alcolometrico del campione

A.4.2.1. Utilizzazione di una bilancia monopiatto.

A.4.2.1.1. Pesare il pallone tara; sia T_1 la sua massa.

A.4.2.1.2. Pesare il picnometro riempito con il distillato preparato (cfr. appendice I), sia P2 la sua massa a t ºC.

A.4.2.1.3. Calcolo

— dT = T1 — T0

— Massa del picnometro vuoto al momento della misurazione

= P – m + dT

— Massa del liquido contenuto nel picnometro a t ºC

= P2 – (P – m + dT)

— Massa volumica a t ºC in g/ml:

— $p_{t\,°C} = [P2 - (P - m + dT)]/V_{20\,°C}$

— Esprimere la massa volumica a t ºC in kg/m³ moltiplicando $p_{t\,°C}$ per 1 000; sia ρ_t questo valore.

— Correggere ρ_t con ρ_{20} utilizzando la tabella delle masse volumiche ρ_t delle miscele idroalcoliche [tabella II dell'allegato II della raccolta dei metodi analitici dell'OIV (1994), pag. 17-29].

Cercare in tabella, sulla linea orizzontale corrispondente al valore intero T della temperatura immediatamente inferiore a t ºC, la più piccola massa volumica superiore a ρ_t. Utilizzare la differenza tabulare letta sotto questa massa volumica per calcolare la massa volumica ρ_t della bevanda spiritosa o dell'alcole a questa temperatura intera T.

— Sulla linea di questa temperatura intera, calcolare la differenza tra la massa volumica ρ' della tabella immediatamente superiore a ρ_t e questa massa volumica ρ_t calcolata. Dividere questa differenza per la differenza tabulare letta a destra della massa volumica ρ'. Il quoziente fornisce la parte decimale del titolo alcolometrico, mentre la parte intera di questo titolo è indicata in testa alla colonna in cui è contenuta la massa volumica ρ' (sia Dt questo titolo alcolometrico).

Nota 4: In alternativa, mantenere il picnometro in un bagno crioter-mostatico a 20 ºC (± 0,2 ºC) nel portarlo alla tacca.

A.4.2.1.4. Risultato

Partendo dalla massa volumica ρ_{20}, calcolare il titolo alcolometrico effettivo mediante le tabelle alcolometriche citate in appresso.

La tabella che dà il valore del titolo alcolometrico volumico (% vol.) a 20 ºC in funzione della massa volumica a 20 ºC delle miscele idroalcoliche è la tabella internazionale adottata dall'Organizzazione Internazionale di Metrologia Legale nella sua raccomandazione n. 22.

A.4.2.2. Utilizzazione di una bilancia a due piatti

A.4.2.2.1. Pesare il picnometro riempito con il distillato preparato (cfr. appendice I); sia p" la sua massa a t ºC.

A.4.2.2.2. Calcolo

— Massa del liquido contenuto nel picnometro a t ºC

= p + m – p"

— Massa volumica a t ºC in g/ml

$p_{t\,°C} = (p + m - p")/V_{20\,°C}$

— Esprimere la massa volumica a t ºC in kg/m³ e procedere alla correzione della temperatura per calcolare il titolo alcolometrico a 20 ºC come indicato precedentemente per l'utilizzazione di una bilancia monopiatto.

▼B

A.5. **Precisione del metodo**

A.5.1. Risultati statistici delle prove interlaboratorio

Uno studio sulla precisione del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale, ha prodotto i seguenti risultati [1] [2].

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	20
Numero di campioni	6

Campioni	A	B	C	D	E	F
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	19	20	17	19	19	17
Numero di risultati aberranti (laboratori)	1	—	2	1	1	3
Numero di risultati accettati	38	40	34	38	38	34
Media ($\bar{x}$) % vol.	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Deviazione standard di ripetibilità (s_r) % vol.	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD_r) (%) vol.	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Limite di ripetibilità (r) % vol.	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) % vol.	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%) vol.	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Limite di riproducibilità (R) % vol.	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Tipi di campione
A Liquori di frutta; frazione (*).
B Brandy; in doppio cieco.
C Whisky; in doppio cieco.
D Grappa; frazione (*).
E Acquavite; frazione (*).
F Rum; frazione (*).

METODO B: DETERMINAZIONE DEL TITOLO ALCOLOMETRICO EFFETTIVO DELLE BEVANDE SPIRITOSE — MISURAZIONE PER DENSIMETRIA ELETTRONICA (BASATA SULL'OSCILLAZIONE DELLE FREQUENZE DI RISONANZA DI UN CAMPIONE IN UNA CELLA OSCILLANTE)

B.1. **Principio**

La massa volumica dei liquidi viene determinata misurando elettronicamente le oscillazioni di un tubo a U vibrante. Per questa misurazione, il campione viene introdotto in un sistema oscillante, la cui frequenza propria viene modificata dalla massa della sostanza introdotta.

B.2. **Reagenti e materiali**

Tranne se altrimenti prescritto, utilizzare soltanto reagenti di qualità analitica riconosciuta e acqua almeno di classe 3, quali definiti in ISO 3696:1987.

B.2.1. Acetone (CAS 666-52-4) o alcole assoluto.

B.2.2. Aria secca.

▼B

B.3. **Apparecchiatura e materiale**

Comune dotazione di laboratorio e in particolare i seguenti elementi:

B.3.1. Densimetro a lettura numerica

Il densimetro elettronico utilizzato per tale misurazione dev'essere in grado di esprimere la massa volumica in g/ml con 5 decimali.

Nota 1: Il densimetro dev'essere posto su un supporto perfettamente stabile e isolato da qualsiasi vibrazione.

B.3.2. Regolazione della temperatura

Il densimetro fornisce prestazioni corrette solo se la cella di misurazione è collegata ad un bagno di regolazione termostatica che permetta di stabilizzare la temperatura almeno entro ± 0,02 ºC.

Nota 2: La regolazione precisa e il controllo della temperatura nella cella di misurazione sono parametri molto importanti: un errore di 0,1 ºC può comportare una variazione della massa volumica dell'ordine di 0,1 kg/m^3.

B.3.3. Siringhe da iniezione o autocampionatore.

B.4. **Modo di operare**

B.4.1. Taratura del densimetro

Tarare l'apparecchio conformemente alle istruzioni del fabbricante in occasione della messa in servizio iniziale. Procedere regolarmente a nuove tarature e controllare l'apparecchio in base a uno standard di riferimento certificato o ad una soluzione di riferimento interna del laboratorio collegata a uno standard di riferimento certificato.

B.4.2. Determinazione della massa volumica del campione

B.4.2.1. Prima della misurazione, se necessario, pulire ed essiccare la cella con acetone o alcole assoluto e aria secca. Risciacquare la cella con il campione.

B.4.2.2. Iniettare il campione nella cella (con l'ausilio di una siringa o di un autocampionatore) fino a riempirla completamente. Nel corso del riempimento, assicurarsi di eliminare completamente le bolle d'aria. Il campione dev'essere omogeneo e non contenere alcuna particella solida. Le materie sospese devono essere rimosse prima dell'analisi mediante filtrazione.

B.4.2.3. Dopo la stabilizzazione della misura, registrare il valore ρ_{20} della massa volumica o del titolo alcolometrico letto sul densimetro.

B.4.3. Risultato

Se si utilizza la massa volumica ρ_{20}, calcolare il titolo alcolometrico volumico effettivo tramite le tabelle alcolometriche citate in appresso.

La tabella che dà il valore del titolo alcolometrico volumico (% vol.) a 20 ºC. in funzione della massa volumica a 20 ºC delle miscele idroalcoliche è la tabella internazionale adottata dall'Organizzazione Internazionale di Metrologia Legale nella sua raccomandazione n. 22.

B.5. **Precisione del metodo**

B.5.1. Risultati statistici delle prove interlaboratorio

Uno studio sulla precisione del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale, ha prodotto i seguenti risultati [1] [2].

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	16
Numero di campioni	6

▼B

Campioni	A	B	C	D	E	F
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	11	13	15	16	14	13
Numero di risultati aberranti (laboratori)	2	3	1	—	1	2
Numero di risultati accettati	22	26	30	32	28	26
Media ($\bar{x}$) % vol.	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) % vol.	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%) vol.	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Limite di ripetibilità (r) % vol.	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) % vol.	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%) vol.	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Limite di riproducibilità (R) % vol.	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Tipi di campione
A Liquori di frutta; frazione (*).
B Brandy; in doppio cieco.
C Whisky; in doppio cieco.
D Grappa; frazione (*).
E Acquavite; frazione (*).
F Rum; frazione (*).

METODO C: DETERMINAZIONE DEL TITOLO ALCOLOMETRICO VOLUMICO EFFETTIVO DELLE BEVANDE SPIRITOSE — MISURAZIONE PER DENSIMETRIA CON BILANCIA IDROSTATICA

C.1. **Principio**

Il titolo alcolometrico delle bevande spiritose può essere misurato per densimetria utilizzando la bilancia idrostatica, basata sul principio di Archimede secondo cui un corpo immerso in un liquido riceve da quest'ultimo una spinta verticale dal basso verso l'alto uguale al peso del liquido spostato.

C.2. **Reagenti e materiali**

Durante l'analisi, tranne se altrimenti prescritto, utilizzare soltanto reagenti di qualità analitica riconosciuta e acqua almeno di classe 3, quali definiti in ISO 3696:1987.

C.2.1. Soluzione detergente del pescante (idrossido di sodio, 30 % m/v)

Per preparare 100 ml di soluzione, pesare 30 g di idrossido di sodio e portare a volume utilizzando etanolo al 96 % vol.

C.3. **Apparecchiatura e materiale**

Comune dotazione di laboratorio e in particolare i seguenti elementi:

C.3.1. Bilancia idrostatica monopiatto con precisione di 1 mg.

C.3.2. Pescante con volume di almeno 20 ml, specificamente adattato alla bilancia, sospeso con un filo di diametro inferiore o uguale a 0,1 mm.

C.3.3. Provetta cilindrica con tacca di livello; il pescante deve poter essere introdotto interamente nella provetta, al di sotto della tacca; la superficie del liquido dev'essere attraversata soltanto dal filo di sospensione; la provetta deve avere un diametro interno maggiore di almeno 6 mm di quello del pescante.

C.3.4. Termometro (o sonda termometrica) con scala in gradi e decimi di grado, da 10 a 40 ºC, calibrato a ± 0,05 ºC.

▼B

C.3.5. Pesi verificati da un organismo riconosciuto di certificazione.

Nota 1: Si può anche utilizzare una bilancia a due piatti, secondo il principio descritto nel capitolo 1 («Massa volumica a 20 ºC e densità relativa a 20 ºC») dell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 (pag. 7).

C.4. **Modo di operare**

Dopo ogni misurazione, il pescante e la provetta devono essere puliti con acqua distillata, asciugati con carta morbida da laboratorio che non lasci fibre e risciacquati con la soluzione di cui si vuole determinare la massa volumica. Le misurazioni devono essere effettuate appena lo strumento è giunto a stabilità in modo da limitare le perdite di alcole per evaporazione.

C.4.1. Taratura della bilancia

Sebbene le bilance siano generalmente munite di un dispositivo interno di taratura, la bilancia idrostatica deve poter essere tarata con pesi controllati da un organismo ufficiale di certificazione.

C.4.2. Taratura del pescante

C.4.2.1. Riempire la provetta sino alla tacca di livello con acqua bidistillata (o di purezza equivalente, ad esempio microfiltrata, di conducibilità 18,2 MΩ/cm) ad una temperatura compresa tra 15 e 25 ºC, ma preferibilmente prossima a 20 ºC.

C.4.2.2. Immergere il pescante e il termometro, agitare, leggere la massa volumica del liquido sullo strumento e, se necessario, correggere la lettura affinché sia uguale a quella dell'acqua alla temperatura di misurazione.

C.4.3. Controllo con soluzione idroalcolica

C.4.3.1. Riempire la provetta sino alla tacca con una soluzione idroalcolica di titolo noto ad una temperatura compresa tra 15 e 25 ºC, ma preferibilmente prossima a 20 ºC.

C.4.3.2. Immergere il pescante e il termometro, agitare e leggere sullo strumento la massa volumica del liquido (o il suo titolo alcolometrico, se lo strumento la consente). Il titolo alcolometrico così determinato dev'essere lo stesso di quello inizialmente noto.

Nota 2: Questa soluzione di titolo alcolometrico noto può servire per la taratura del pescante, invece dell'acqua bidistillata.

C.4.4. Misurazione della massa volumica di un distillato (o del suo titolo alcolometrico, se lo strumento la consente)

C.4.4.1. Versare il campione nella provetta cilindrica sino alla tacca.

C.4.4.2. Immergere il pescante e il termometro, agitare e leggere sullo strumento la massa volumica del liquido (o il suo titolo alcolometrico, se lo strumento la consente). Annotare la temperatura se la massa volumica viene misurata a t ºC (ρ_t).

C.4.4.3. Correggere ρ_t con ρ_{20} utilizzando la tabella delle masse volumiche ρT delle miscele idroalcoliche [tabella II dell'allegato II della raccolta dei metodi analitici dell'OIV (1994), pag. 17-29].

C.4.5. Pulitura del pescante e della provetta

C.4.5.1. Immergere il pescante nella soluzione detergente posta nella provetta cilindrica.

C.4.5.2. Lasciare a contatto per un'ora, imprimendo periodicamente al pescante un movimento rotatorio.

C.4.5.3. Risciacquare con abbondante acqua corrente e poi con acqua distillata.

C.4.5.4. Asciugare con carta morbida da laboratorio che non lasci fibre.

Effettuare quest'operazione alla prima utilizzazione del pescante e poi periodicamente, quando necessario.

C.4.6. Risultato

Partendo dalla massa volumica ρ_{20}, calcolare il titolo alcolometrico volumico effettivo mediante le tabelle alcolometriche citate in appresso.

La tabella che dà il valore del titolo alcolometrico volumico (% vol.) a 20 ºC in funzione della massa volumica a 20 ºC delle miscele idroalcoliche è la tabella internazionale adottata dall'Organizzazione Internazionale di Metrologia Legale nella sua raccomandazione n. 22.

▼B

C.5. **Precisione del metodo**

C.5.1. Risultati statistici delle prove interlaboratorio

Uno studio sulla precisione del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale, ha prodotto i seguenti risultati [1] [2].

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	12
Numero di campioni	6

Campioni	A	B	C	D	E	F
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	12	10	11	12	11	9
Numero di risultati aberranti (laboratori)	—	2	1	—	1	2
Numero di risultati accettati	24	20	22	24	22	18
Media ($\bar{x}$) % vol.	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) % vol.	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%) vol.	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Limite di ripetibilità (r) % vol.	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) % vol.	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%) vol.	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Limite di riproducibilità (R) % vol.	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Tipi di campione
A Liquori di frutta; frazione (*).
B Brandy; in doppio cieco.
C Whisky; in doppio cieco.
D Grappa; frazione (*).
E Acquavite; frazione (*).
F Rum; frazione (*).

▼B

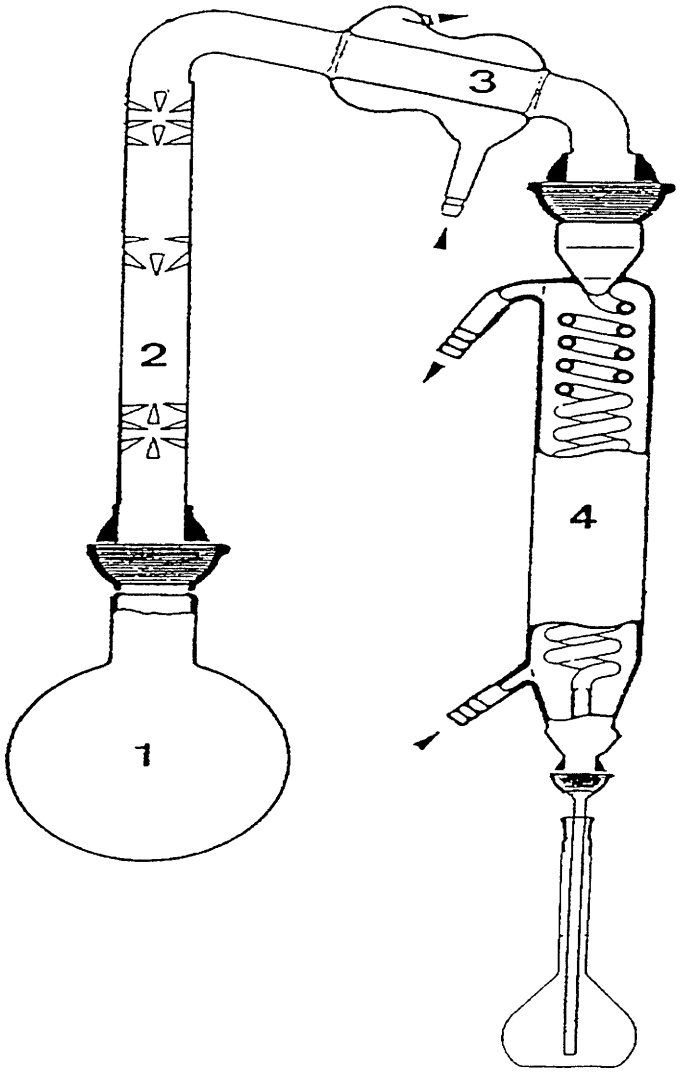


Figura 1. Apparecchio di distillazione per la misurazione del titolo alcolometrico volumico effettivo delle bevande spiritose

1. Pallone della capacità di un litro con raccordo sferico smerigliato standardizzato.
2. Colonna di rettifica di Vigreux della lunghezza di 20 cm.
3. Refrigerante a bordi dritti di West della lunghezza di 10 cm.
4. Refrigerante a serpentina della lunghezza di 40 cm.

▼B

II. DETERMINAZIONE DELL'ESTRATTO SECCO TOTALE DELLE BEVANDE — METODO GRAVIMETRICO

1. Campo d'applicazione

▼C1

Il regolamento (CEE) n. 1576/89 prevede questa determinazione solo nel caso dell'acquavit, per la quale il limite massimo per l'estratto secco è di 15 g/l.

▼B

2. Riferimenti normativi

ISO 3696:1987: Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova.

3. Definizione

L'estratto secco totale (o sostanze secche totali) è costituito dall'insieme di tutte le sostanze che, in condizioni fisiche determinate, non volatilizzano.

4. Principio

Pesatura del residuo lasciato per evaporazione delle bevande spiritose in bagno criotermostatico bollente ed essiccazione in un forno.

5. Apparecchiatura e materiale

5.1. Capsula d'evaporazione cilindrica a fondo piatto del diametro di 55 mm.

5.2. Bagno criotermostatico bollente.

5.3. Pipetta da 25 ml di classe A.

5.4. Forno per l'essiccazione.

5.5. Essiccatore.

5.6. Bilancia analitica con precisione di 0,1 mg.

6. Campionatura e campioni

Prima dell'analisi, conservare i campioni a temperatura ambiente.

7. Modo di operare

7.1. Pipettare 25 ml di bevanda spiritosa, contenente meno di 15 g di sostanza secca/l, in una capsula d'evaporazione cilindrica a fondo piatto del diametro di 55 mm, preventivamente tarata. Durante la prima ora di evaporazione, la capsula viene posta sul coperchio di un bagno criotermostatico bollente in modo che il liquido non venga portato all'ebollizione, perché ciò potrebbe provocare qualche perdita per la formazione di spruzzi. Lasciare un'altra ora direttamente in contatto con il vapore del bagno criotermostatico bollente.

7.2. Terminare l'essiccazione ponendo la capsula in un forno a 105 ºC ± 3 ºC per altre due ore. Lasciare quindi raffreddare la capsula in un essiccatore e pesare la capsula e il suo contenuto.

8. Calcolo

La massa del residuo moltiplicata per 40 corrisponde all'estratto secco della bevanda spiritosa, che dev'essere espresso in g/l alla prima cifra decimale.

9. Precisione del metodo

9.1. Risultati statistici delle prove interlaboratorio

Uno studio sulla precisione del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale, ha prodotto i seguenti risultati [1] [2].

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	10
Numero di campioni	4

▼B

Campioni	A	B	C	D
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	9	9	8	9
Numero di risultati aberranti (laboratori)	1	1	2	—
Numero di risultati accettati	18	18	16	18
Media ($\bar{x}$) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Limite di ripetibilità (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Limite di riproducibilità (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Rum; frazione.
C Grappa; frazione.
D Acquavite; frazione.

▼B

III. DETERMINAZIONE DI SOSTANZE VOLATILI E METANOLO NELLE BEVANDE SPIRITOSE

III.1. OSSERVAZIONI GENERALI

1. **Definizioni**

Il regolamento (CEE) n. 1576/89 stabilisce per un certo numero di acquaviti (rum, acquaviti di origine viticola, acquaviti di frutta ecc.) un tenore minimo di sostanze volatili diverse dall'etanolo e dal metanolo. Convenzionalmente, ed esclusivamente per i prodotti di questo tipo, il tenore è costituito da una somma comprendente i tenori di:

1) acidi volatili (acidità volatile), espressi in acido acetico;

2) aldeidi, espresse in acetaldeide in base alla somma dell'acetaldeide e della frazione di acetaldeide contenuta in 1,1-dietossi-etano (acetale);

3) alcoli superiori propan-1-olo, butan-1-olo, butan-2-olo e 2-metil-propan-1-olo, espressi in ciascuno degli alcoli individualmente dosati, e 2-metilbutan-1-olo e 3-metilbutan-1-olo, espressi in ciascuno degli alcoli individualmente dosati o nella somma dei due;

4) acetato di etile.

I metodi convenzionali che permettono di misurare le sostanze volatili sono i seguenti:

— gli acidi volatili vengono determinati mediante misura dell'acidità volatile;

— le aldeidi (acetaldeide e acetale), l'acetato di etile e gli alcoli vengono dosati per gascromatografia.

2. **Determinazione per gascomatografia delle sostanze volatili**

La determinazione per gascromatografia di sostanze volatili differenti da quelle indicate più sopra può dimostrarsi particolarmente interessante per scoprire l'origine della materia prima utilizzata per la distillazione, nonché per determinare le condizioni stesse della distillazione.

Certe bevande spiritose contengono altri costituenti volatili, segnatamente sostanze aromatiche, caratteristici della natura delle materie prime utilizzate per l'ottenimento dell'alcole, dell'aroma delle bevande spiritose stesse e delle specificità della preparazione. Queste sostanze sono importanti per la valutazione dei requisiti fissati dal regolamento (CEE) n. 1576/89.

III.2. DETERMINAZIONE PER GASCROMATOGRAFIA DEI COMPOSTI VOLATILI: ALDEIDI, ALCOLI SUPERIORI, ACETATO D'ETILE E METANOLO

1. **Campo d'applicazione**

Il metodo è adatto per la determinazione di 1,1-dietossietano (acetale), 2-metilbutan-1-olo (alcole amilico), 3-metilbutan-1-olo (alcole isoamilico), metanolo (alcole metilico), etanoato di etile (acetato di etile), butan-1-olo (n-butanolo), butan-2-olo (sec-butanolo), 2-metilpropan-1-olo (alcole isobutilico), propan-1-olo (n-propanolo) e acetaldeide. Si utilizza uno standard interno, ad esempio pentan-3-olo. Le concentrazioni degli analiti sono espresse in grammi per 100 litri di alcole assoluto; il titolo alcolometrico del prodotto dev'essere determinato prima dell'analisi. Tra le bevande spiritose che possono essere analizzate con questo metodo figurano il whisky, il brandy, il rum, le acquaviti di vino, di frutta e di vinaccia.

2. **Riferimenti normativi**

ISO 3696:1987: Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova.

3. **Definizione**

I composti sono sostanze volatili che si formano insieme all'etanolo durante la fermentazione, la distillazione e la maturazione delle bevande spiritose.

▼B

4. **Principio**

I composti nelle bevande spiritose si individuano iniettando direttamente la bevanda spiritosa, pura od opportunamente diluita, in un gascromatografo. Prima dell'iniezione si aggiunge alla bevanda spiritosa uno standard interno adeguato. I composti sono separati con programmazione della temperatura su una colonna adeguata e sono individuati per mezzo di un rivelatore a ionizzazione di fiamma. La concentrazione di ogni composto è determinata in rapporto allo standard interno tramite i coefficienti di risposta, che sono ottenuti durante la taratura ricorrendo a condizioni di cromatografia identiche a quelle dell'analisi della bevanda spiritosa.

5. **Reagenti e materiali**

Salvo indicazione contraria, utilizzare esclusivamente reagenti di purezza superiore al 97 % acquistati da un fornitore accreditato presso l'ISO e dotati di un certificato di purezza, esenti da altri composti al momento della diluizione di prova (ciò si può confermare iniettando singoli standard di composti nella diluizione nelle condizioni di gascromatografiche di cui al punto 6.4) e soltanto acqua almeno di classe 3, quale definita in ISO 3696. L'acetale e l'acetaldeide devono essere conservati al buio ad una temperatura inferiore a 5 ºC; tutti gli altri reagenti devono essere conservati a temperatura ambiente.

5.1. Etanolo assoluto (CAS 64-17-5).

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

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

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

5.5. Standard interni accettabili: pentan-3-olo (CAS 584-02-1), pentan-1-olo (CAS 71-41-0), 4-metilpentan-1-olo (CAS 626-89-1) e nonanoato di metile (CAS 1731-84-6).

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

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

5.8. Acetato di etile (CAS 141-78-6).

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

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

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

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

5.13. Soluzione etanolica 40 % v/v.

Per preparare una soluzione etanolica a 400 ml/l, porre 400 ml di etanolo (5.1) in un matraccio tarato da 1 l e portare a volume con acqua distillata miscelando accuratamente.

5.14. Preparazione e conservazione delle soluzioni di taratura (procedura utilizzata per il metodo convalidato).

Tutte le soluzioni di taratura devono essere conservate a temperatura inferiore a 5 ºC e rinnovate una volta al mese. Le masse dei componenti e delle soluzioni vanno registrate con la precisione di 0,1 mg.

5.14.1. Soluzione di taratura — A

Pipettare i seguenti reagenti in un matraccio tarato da 100 ml, contenente circa 60 ml di soluzione etanolica (5.13) in modo da limitare le perdite di componenti per evaporazione; portare a volume con la soluzione etanolica (5.13) e miscelare accuratamente. Registrare il peso del matraccio, di ogni componente aggiunto e il peso totale finale del contenuto.

Componenti	Volume (ml)
Metanolo (5.2)	3,0
Propan-1-olo (5.3)	3,0
2-metilpropan-1-olo (5.4)	3,0
2-metilbutan-1-olo (5.6)	3,0
3-metilbutan-1-olo (5.7)	3,0
Acetato di etile (5.8)	3,0
Butan-1-olo (5.9)	3,0

▼B

Componenti	Volume (ml)
Butan-2-olo (5.10)	3,0
Acetaldeide (5.11)	3,0
Acetale (5.12)	3,0

Nota 1: È preferibile aggiungere acetale ed acetaldeide per ultimi, per limitare le perdite dovute a evaporazione.

5.14.2. Soluzione di taratura — B

Pipettare 3 ml di pentan-3-olo o di un altro standard interno adeguato (5.5) in un matraccio da 100 ml contenente circa 80 ml di soluzione etanolica (5.13), portare a volume con soluzione etanolica (5.13) e miscelare accuratamente.

Registrare il peso del matraccio, quello del pentan-3-olo o dell'altro standard interno aggiunto e il peso totale finale del contenuto.

5.14.3. Soluzione di taratura — C

Pipettare 1 ml di soluzione A (5.14.1) e 1 ml di soluzione B (5.14.2) in un matraccio da 100 ml contenente circa 80 ml di soluzione etanolica (5.13), portare a volume con soluzione etanolica (5.13) e miscelare accuratamente.

Registrare il peso del matraccio, di ogni componente aggiunto e il peso totale finale del contenuto.

5.14.4. Soluzione di taratura — D

Al fine di mantenere la continuità dell'analisi, preparare uno standard per il controllo della qualità utilizzando lo standard A precedentemente preparato (5.14.1). Pipettare 1 ml di soluzione A (5.14.1) in un matraccio da 100 ml contenente circa 80 ml di soluzione etanolica (5.13), portare a volume con soluzione etanolica (5.13) e miscelare accuratamente.

Registrare il peso del matraccio, di ogni componente aggiunto e il peso totale finale del contenuto.

5.14.5. Soluzione di taratura — E

Pipettare 10 ml di soluzione B (5.14.2) in un matraccio da 100 ml contenente circa 80 ml di soluzione etanolica (5.13), portare a volume con soluzione etanolica (5.13) e miscelare accuratamente.

Registrare il peso del matraccio, di ogni componente aggiunto e il peso totale finale del contenuto.

5.14.6. Soluzioni di taratura utilizzate per controllare la linearità di risposta del rivelatore a ionizzazione di fiamma

Pipettare 0, 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 ml di soluzione A (5.14.1) e 1 ml di soluzione B (5.14.2) in matracci da 100 ml contenenti circa 80 ml di soluzione etanolica (5.13), portare a volume con soluzione etanolica (5.13) e miscelare accuratamente.

Registrare il peso del matraccio, di ogni componente aggiunto e il peso totale finale del contenuto.

5.14.7. Soluzione di taratura per il controllo della qualità

Pipettare 9 ml di soluzione di taratura D (5.14.4) e 1 ml di soluzione di taratura E (5.14.5) in un recipiente di pesatura e miscelare accuratamente.

Registrare il peso del matraccio, di ogni componente aggiunto e il peso totale finale del contenuto.

6. **Apparecchiatura e materiale**

6.1. Apparecchiatura per la misurazione della massa volumica e del titolo alcolometrico.

6.2. Bilancia analitica, in grado di misurare 4 decimali.

6.3. Gascromatografo a programmazione della temperatura, dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma e di un integratore (o di altro sistema di trattamento dati) in grado di misurare le superfici o le altezze dei picchi.

▼B

6.4. Una o più colonne gascromatografiche, in grado di separare gli analiti in modo che la risoluzione minima tra i singoli componenti (diversi dal 2-metilbutan-1-olo e dal 3-metilbutan-1-olo) sia almeno di 1,3.

Nota 2: Sono ritenute adeguate le seguenti colonne e le seguenti condizioni gascromatografiche:

1) Percolonna di ritenzione di 1 m × 0,32 mm di diametro interno associata a una colonna di CP-WAX 57 CB di 50 m × 0,32 mm di diametro interno, con spessore della fase stazionaria di 0,2 µm (polietilenglicolo stabilizzato) seguita da una colonna Carbowax 400 di 50 m × 0,32 mm di diametro interno, con spessore della fase stazionaria di 0,2 µm (le colonne sono collegate mediante raccordi a contatto diretto).

Gas di trasporto e pressione:	elio (135 kPa)
Temperatura della colonna:	isoterma a 35 ºC per 17 min., programata da 35 ºC a 70 ºC a 12 ºC/min, isoterma a 70 ºC per 25 min
Temperatura dell'iniettore:	150 ºC
Temperatura del rivelatore:	250 ºC
Volume di iniezione:	1 µl, split 1:20-100

2) Precolonna di 1 m × 0,32 mm di diametro interno collegata a una colonna CP-WAX 57 CB di 5 m × 0,32 mm di diametro interno, con spessore della fase stazionaria (polietilenglicolo stabilizzato) di 0,2 µm la precolonna è collegata alla colonna con un raccordo a contatto diretto.

Gas di trasporto e pressione:	elio (65 kPa)
Temperatura della colonna:	isoterma 35 ºC per 10 min, programmata da 35 ºC a 110 ºC a 5 ºC/min, programmata da 110 ºC a 190 ºC a 30 ºC/min, isoterma a 190 ºC per 2 min
Temperatura dell'iniettore:	260 ºC
Temperatura del rivelatore:	300 ºC
Volume di iniezione:	1 µl, split 1:55-100

3) Colonna impaccata (5 % CW 20M, Carbopak B) di 2 m × 2 mm di diametro interno.

Temperatura della colonna:	65 ºC per 4 min, da 65 ºC a 140 ºC a 10 ºC/min, mantenuta a 140 ºC per 5 min, da 140 ºC a 150 ºC a 5 ºC/min, mantenuta a 150 ºC per 3 min
Temperatura dell'iniettore:	65 ºC
Temperatura del rivelatore:	200 ºC
Volume di iniezione:	1 µl

7. **Campionatura e campioni**

7.1. Campione di laboratorio.

Si misura il titolo alcolometrico (6.1) di ogni campione appena giunto in laboratorio.

8. **Modo di operare (procedura utilizzata per il metodo convalidato)**

8.1. Aliquota da analizzare

8.1.1. Pesare un adeguato recipiente da pesatura chiuso e registrare il peso.

▼B

8.1.2. Pipettare 9 ml di campione da laboratorio nel recipiente e registrare il peso ($M_{CAMPIONE}$).

8.1.3. Aggiungere 1 ml di soluzione di taratura E (5.14.5) e registrare il peso (M_{IS}).

8.1.4. Agitare vigorosamente il campione, capovolgendolo almeno 20 volte. Prima dell'analisi i campioni devono essere conservati a temperatura inferiore a 5 ºC, in modo da limitare le perdite di sostanze volatili.

8.2. Prova in bianco

8.2.1. Con una bilancia in grado di misurare 4 cifre decimali (6.2) pesare un adeguato recipiente da pesatura chiuso e registrare il peso.

8.2.2. Pipettare 9 ml di soluzione etanolica da 400 ml/l (5.13) nel recipiente e registrare il peso.

8.2.3. Aggiungere 1 ml di soluzione di taratura E (5.14.5) e registrare il peso.

8.2.4. Agitare vigorosamente il materiale, capovolgendolo almeno 20 volte. Prima dell'analisi i campioni devono essere conservati a temperatura inferiore a 5 ºC, in modo da limitare le perdite di sostanze volatili.

8.3. Prova preliminare

Iniettare la soluzione di taratura C (5.14.3) affinché tutti gli analiti siano separati con una risoluzione minima di 1,3 (tranne il 2-metil-butan-1-olo e il 3-metilbutan-1-olo).

8.4. Taratura

Occorre controllare la taratura con la seguente procedura. Assicurarsi che la risposta sia lineare analizzando successivamente per tre volte ognuna delle soluzioni di taratura di controllo della linearità (5.14.6) contenenti lo standard interno. Sulla base delle superfici o delle altezze dei picchi fornite dall'integratore calcolare, per ogni iniezione, il rapporto R per ogni composto e disegnare un grafico di R in funzione del rapporto C tra la concentrazione del composto e quella dello standard interno. Ne dovrebbe risultare un grafico lineare con un coefficiente di correlazione di almeno 0,99.

$$R = \frac{\text{Superficie o altezza del picco del composto}}{\text{Superficie o altezza del picco dello standard interno}}$$

$$C = \frac{\text{Concentraz. composto (µg / g)}}{\text{Concentraz. standard interno (µg / g)}}$$

8.5. Determinazione

Iniettare la soluzione di taratura C (5.14.3) e due soluzioni di taratura per il controllo della qualità (5.14.7). Proseguire con campioni non noti (preparati secondo quanto prescritto ai punti 8.1 e 8.2) inserendo una soluzione di taratura per il controllo della qualità ogni 10 campioni per garantire la stabilità dell'analisi. Iniettare una soluzione di taratura C (5.14.3) ogni 5 campioni.

9. **Calcolo**

Si può utilizzare un sistema automatico di trattamento dati, a condizione che questi possano essere controllati secondo i principi descritti nel metodo di cui sopra.

Misurare le superfici o le altezze dei picchi dei composti e dello standard interno.

9.1. Calcolo del coefficiente di risposta

In base al cromatogramma dell'iniezione della soluzione di taratura C (5.14.3), calcolare i coefficienti di risposta di ogni composto utilizzando la formula (1).

$$(1)\ \text{Coefficiente di risposta} = \frac{\text{Superficie o altezza del picco dello standard interno}}{\text{Superificie o altezza del picco del composto}} \times \frac{\text{Conc. composto (µg / g)}}{\text{Conc. IS (µg / g)}}$$

▼B

dove:

IS = standard interno

Conc. composto = concentrazione del composto nella soluzione C (5.14.3)

Conc. IS = concentrazione dello standard interno nella soluzione C (5.14.3)

9.1.2. Analisi del campione

Utilizzando la formula (2), calcolare la concentrazione di ogni composto nei campioni.

(2) Concentrazione del composto (µg/g) =

$$\frac{\text{Superficie o altezza del picco del composto}}{\text{Superficie o altezza del picco dell'IS}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{M_{CAMPIONE}\ (g)} \times \text{Conc. IS (µg / g)} \times RF$$

dove:

$M_{CAMPIONE}$ = peso del campione (8.1.2)

M_{IS} = peso dello standard interno (8.1.3)

Conc. IS = concentrazione dello standard interno nella soluzione E (5.14.5)

RF = coefficiente di risposta calcolato con la formula (1)

9.1.3. Analisi della soluzione di taratura per il controllo della qualità

Utilizzando la formula (3), calcolare la percentuale di recupero del valore-bersaglio per ogni composto negli standard per il controllo di qualità (5.14.7):

(3) % recupero del campione per il controllo della qualità =

$$\frac{\text{concentraz. analita nello standard per il controllo della qualità}}{\text{concentraz. analita nella soluzione D}} \times 100$$

La concentrazione dell'analita nello standard per il controllo della qualità si calcola utilizzando le precedenti formule (1) e (2).

9.2. Presentazione finale dei risultati

I risultati sono convertiti da µg/g in g per 100 litri di alcole assoluto per i campioni utilizzando la formula (4):

(4) Concentrazione in g per 100 litri di alcole assoluto =

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

dove

p = massa volumica in kg/m³.

I risultati sono espressi fino a 3 cifre significative, con al massimo una cifra decimale (ad esempio: 11,4 g/100 l di alcole assoluto).

10. **Garanzia e controllo della qualità (utilizzati per il metodo convalidato)**

Utilizzando la precedente formula (2), calcolare la concentrazione di ogni composto nelle soluzioni di calibrazione per il controllo della qualità preparate seguendo le procedure di cui ai punti da 8.1.1 a 8.1.4. Utilizzando la formula (3), calcolare la percentuale di recupero del valore-bersaglio. Se i risultati sono compresi entro il ± 10 % dei loro valori teorici per ogni composto, l'analisi può procedere. Diversamente occorre ricercare la causa dell'imprecisione e prendere le opportune misure correttive.

11. **Precisione del metodo**

Risultati statistici delle prove interlaboratorio. Nelle seguenti tabelle figurano i valori relativi ai seguenti composti: acetaldeide, acetato

▼B

d'etile, acetale, acetaldeide totale, metanolo, butan-2-olo, propan-1-olo, butan-1-olo, metanol-1-olo, 2 metil-butan-1-olo, 3 metil-butan-1-olo.

Uno studio sulla precisione del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale, ha prodotto i seguenti risultati [1] [2].

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	Acetaldeide

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	28	26	27	27	28
Numero di risultati aberranti (laboratori)	2	4	3	3	2
Numero di risultati accettati	56	52	54	54	56
Media ($\bar{x}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8 (*)	28,6 52,2 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Limite di ripetibilità (r) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Limite di riproducibilità (R) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	Acetato di etile

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	24	24	25	24	24
Numero di risultati aberranti (laboratori)	2	2	1	2	2
Numero di risultati accettati	48	48	50	48	48
Media ($\bar{x}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4

▼B

Campioni	A	B	C	D	E
Limite di ripetibilità (r) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Limite di riproducibilità (R) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	Acetale

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	20	21	22	17	21
Numero di risultati aberranti (laboratori)	4	3	2	4	3
Numero di risultati accettati	40	42	44	34	42
Media ($\bar{x}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60 (*)	15,1 28,3 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Limite di ripetibilità (r) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Limite di riproducibilità (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	Acetaldeide totale

▼B

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	23	19	22	21	22
Numero di risultati aberranti (laboratori)	1	5	2	3	2
Numero di risultati accettati	46	38	44	42	44
Media ($\bar{x}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8 (*)	32,7 61,8 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Limite di ripetibilità (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Limite di riproducibilità (R) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	Metanolo

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	26	27	27	28	25
Numero di risultati aberranti (laboratori)	4	3	3	1	4
Numero di risultati accettati	52	54	54	56	50
Media ($\bar{x}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Limite di ripetibilità (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Limite di riproducibilità (R) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Tipo di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

▼B

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	4
Analita	Butan-2-olo

Campioni	A	B	C	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	21	27	29	22
Numero di risultati aberranti (laboratori)	4	3	1	3
Numero di risultati accettati	42	54	58	44
Media ($\bar{x}$) µg/g.	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Limite di ripetibilità (r) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Limite di riproducibilità (R) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
E Rum; frazione (*).

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	Propan-1-olo

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	29	27	27	29	29
Numero di risultati aberranti (laboratori)	2	4	3	2	2
Numero di risultati accettati	58	54	54	58	58
Media ($\bar{x}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Limite di ripetibilità (r) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Limite di riproducibilità (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

▼B

Tipi di camione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

Anno della provra interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	3
Analita	Butan-1-olo

Campioni	A	B	C
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	20	22	22
Numero di risultati aberranti (laboratori)	4	4	6
Numero di risultati accettati	40	44	44
Media ($\bar{x}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	0,43	0,20	0,43
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Limite di ripetibilità (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Limite di riproducibilità (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	2-metilpropan-1-olo

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	28	31	30	26	25
Numero di risultati aberranti (laboratori)	3	0	1	5	6
Numero di risultati accettati	56	62	60	52	50
Media ($\bar{x}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0 246,8 (*)	115,99 133,87 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Limite di ripetibilità (r) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2

▼B

Campioni	A	B	C	D	E
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Limite di riproducibilità (R) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	2-metilbutan-1-olo

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	25	26	25	27	25
Numero di risultati aberranti (laboratori)	3	2	3	1	2
Numero di risultati accettati	50	52	50	54	50
Media ($\bar{x}$) µg/g.	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2 (*)	39,5 61,5 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Limite di ripetibilità (r) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Limite di riproducibilità (R) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco.
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

Anno della prova interlaboratorio	1997
Numero di laboratori	32
Numero di campioni	5
Analita	3-metilbutan-1-olo

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	23	23	24	27	21

▼B

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di risultati aberranti (laboratori)	5	5	4	1	6
Numero di risultati accettati	46	46	48	54	42
Media ($\bar{x}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Deviazione standard della ripetibilità (s_r) µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Limite di ripetibilità (r) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Deviazione standard della riproducibilità (s_R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Limite di riproducibilità (R) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Tipi di campione
A Brandy; in doppio cieco.
B Kirsch; in doppio cieco
C Grappa; in doppio cieco.
D Whisky; frazione (*).
E Rum; frazione (*).

▼M1

V. ANETOLO. DETERMINAZIONE PER GASCROMATOGRAFIA DEL TRANS-ANETOLO NELLE BEVANDE SPIRITOSE

1. Campo di applicazione

Il metodo è adatto per la determinazione del trans-anetolo nelle bevande spiritose all'anice mediante gascromatografia capillare.

2. Riferimenti normativi

ISO 3696: 1987 Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova

3. Principio

Il tenore di trans-anetolo nelle bevande spiritose viene determinato mediante gascromatografia (GC). La stessa quantità di uno standard interno, ad esempio 4-allilanisolo (estragolo) quando l'estragolo non è naturalmente presente nel campione, è aggiunta al campione e ad una soluzione di riferimento di concentrazione nota; entrambi sono poi diluiti con una soluzione etanolica al 45 % in vol. e iniettati direttamente nel sistema GC. È necessario effettuare un'estrazione prima della preparazione del campione e dell'analisi per i liquori che contengono quantità elevate di zuccheri.

4. Reagenti e materiali

Durante l'analisi usare soltanto reagenti di purezza non inferiore al 98 % e acqua almeno di classe 3, quale definita in ISO 3696.

Le sostanze di riferimento devono essere conservate in frigorifero (a circa 4 ºC), al riparo dalla luce, in contenitori di alluminio o in boccette per reagenti di vetro colorato (ambra). I tappi saranno preferibilmente dotati di una guarnizione a tenuta stagna in alluminio. Il trans-anetolo dovrà essere portato, prima dell'uso, allo stato liquido dal suo stato cristallino, comunque con un riscaldamento che non superi i 35 ºC.

4.1. Etanolo, 96 % in vol. (CAS 64-17-5)

4.2. 1-metossi-4-(1-propenil) benzene; (trans-anetolo) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-allilanisolo (estragolo) (CAS 140-67-0), standard interno consigliato.

4.4. Etanolo, 45 % in vol.

Aggiungere 560 g di acqua distillata a 378 g di etanolo al 96 % in vol.

4.5. Preparazione delle soluzioni di calibrazione

Tutte le soluzioni di calibrazione devono essere conservate a temperatura ambiente (15-35 ºC), al riparo dalla luce, in contenitori di alluminio o in boccette per reagenti, di vetro colorato (ambra). I tappi saranno preferibilmente dotati di una guarnizione a tenuta stagna in alluminio.

Il trans-anetolo e il 4-allilanisolo sono praticamente insolubili in acqua; è pertanto necessario scioglierli in etanolo al 96 % in vol. (4.1) prima dell'aggiunta di etanolo al 45 % in vol. (4.4).

Preparare le soluzioni madri settimanalmente.

4.5.1. Soluzione di calibrazione A

Soluzione madre di trans-anetolo (concentrazione: 2 g/l).

Pesare 40 mg di trans-anetolo (4.2) in un matraccio tarato da 20 ml (oppure 400 mg in uno da 200 ml, ecc.). Aggiungere etanolo al 96 % in vol. (4.1) e portare a volume con etanolo al 45 % in vol. (4.4); miscelare accuratamente.

4.5.2. Soluzione dello standard interno B

Soluzione madre dello standard interno, ad esempio estragolo (concentrazione: 2 g/l).

Pesare 40 mg di estragolo (4.3) in un matraccio tarato da 20 ml (oppure 400 mg in uno da 200 ml, ecc.). Aggiungere dell'etanolo al 96 % in vol. (4.1) e portare a volume con etanolo al 45 % in vol (4.4); miscelare accuratamente.

▼M1

4.5.3. Soluzioni utilizzate per controllare la linearità della risposta del rivelatore a ionizzazione di fiamma

La linearità della risposta del rivelatore a ionizzazione di fiamma deve essere controllata per l'analisi tenendo conto di una gamma di concentrazioni da 0 g/l fino a 2,5 g/l di trans-anetolo nelle bevande spiritose. Nella procedura di analisi, i campioni di bevande spiritose da analizzare vengono diluiti 10 volte (8.3). Preparare nel modo seguente soluzioni madre corrispondenti rispettivamente a concentrazioni di 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, e 0,25 g/l di trans-anetolo nel campione da analizzare: prelevare 0,5, 1, 1,5, 2, e 2,5 ml di soluzione madre A (4.5.1) e pipettarle separatamente in matracci tarati da 20 ml; pipettare poi in ogni matraccio 2 ml di soluzione dello standard interno B (4.5.2) e portare a volume con etanolo al 45 % in vol. (4.4); miscelare accuratamente.

La soluzione di prova in bianco (8.4) viene usata come soluzione a 0 g/l.

4.5.4. Soluzione di calibrazione C

Pipettare 2 ml di soluzione A (4.5.1) e trasferirli in un matraccio tarato da 20 ml; aggiungere 2 ml della soluzione B (4.5.2), portare a volume con etanolo al 45 % in vol. (4.4) e miscelare accuratamente.

5. **Apparecchiatura e materiale**

5.1. Gascromatografo per colonne capillari dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma e di un integratore o di altro sistema di acquisizione e trattamento dati in grado di misurare le altezze o le aree dei picchi e di un dispositivo automatico di campionamento o di un iniettore manuale.

5.2. Iniettore tipo Split/Splitless

5.3. Colonna capillare (a titolo esemplificativo):

Lunghezza: 50 m

Diametro interno: 0,32 mm

Spessore del film: 0,2 μm

Fase stazionaria tipo FFAP — TPA modificato, in forma legata (polimero poroso reticolato di tipo polietilenglicole)

5.4. Materiale di uso corrente per laboratori d'analisi: vetreria tarata di precisione, bilancia analitica (precisione: ± 0,1 mg).

6. **Condizioni cromatografiche**

Il tipo e le dimensioni della colonna e le condizioni gascromatografiche devono essere tali che l'anetolo e lo standard interno siano separati tra loro e da eventuali sostanze che possono interferire. Le condizioni tipiche per la colonna presentata a titolo esemplificativo al punto 5.3 sono le seguenti:

6.1. Gas di trasporto: elio di qualità analitica

6.2. Portata: 2 ml/min

6.3. Temperatura dell'iniettore: 250 ºC

6.4. Temperatura del rivelatore: 250 ºC

6.5. Condizioni di temperatura del forno: isoterma a 180 ºC per 10 minuti

6.6. Volume di iniezione: 1 μl, split 1:40

7. **Campioni**

Conservare i campioni a temperatura ambiente, al riparo dalla luce e dal freddo.

8. **Procedimento**

8.1. Esame del campione per determinare l'eventuale presenza di estragolo

Per accertarsi che l'estragolo non sia naturalmente presente nel campione, eseguire un'analisi in bianco senza aggiunta di standard interni. Se l'estragolo è naturalmente presente, scegliere un altro standard interno (ad esempio mentolo).

Pipettare 2 ml di campione in un matraccio tarato da 20 ml e portare a volume con etanolo al 45 % in vol. (4.4); miscelare accuratamente.

▼M1

8.2. Preparazione del campione per l'analisi dell'anetolo

Pipettare 2 ml di campione in un matraccio tarato da 20 ml; aggiungere 2 ml di soluzione dello standard interno B (4.5.2), portare a volume con etanolo al 45 % in vol. (4.4) e miscelare accuratamente.

8.3. Prova in bianco

Pipettare 2 ml di soluzione dello standard interno B (4.5.2) in un matraccio tarato da 20 ml; portare a volume con etanolo al 45 % in vol. (4.4) e miscelare accuratamente.

8.4. Prova della linearità della risposta

Prima di cominciare l'analisi, controllare la linearità della risposta del rivelatore a ionizzazione di fiamma iniettando per tre volte successive ognuna delle soluzioni di calibrazione per il controllo della linearità (4.5.3).

In base ai valori delle aree o delle altezze dei picchi fornite dall'integratore, tracciare, per ogni iniezione, un grafico della concentrazione della soluzione madre in g/l in funzione del rapporto R di ciascuna.

R = altezza o area del picco del trans-anetolo divisa per l'altezza o per l'area del picco dell'estragolo

Dovrebbe risultare un grafico lineare.

8.5. Determinazione

Iniettare la soluzione del bianco (8.3), poi la soluzione C (4.5.4), poi una delle soluzioni per il controllo della linearità (4.5.3) che funzionerà come campione per il controllo di qualità (questa potrebbe essere scelta tenendo conto del probabile tenore di trans-anetolo nel campione), poi cinque campioni in analisi (8.2); inserire un campione di linearità (controllo di qualità) ogni cinque campioni in analisi per appurare la stabilità analitica.

9. **Calcolo del fattore di risposta**

Misurare le aree dei picchi (utilizzando un integratore o un altro sistema di trattamento dei dati) o le altezze dei picchi (integrazione manuale) del trans-anetolo e quelle dei picchi dello standard interno.

9.1. Calcolo del fattore di risposta (RF_i)

Il fattore di risposta si calcola come segue:

RFi = (Ci/area o altezzai)*(area o altezzais/Cis)

dove:

C_i = concentrazione del trans-anetolo nella soluzione A (4.5.1)

C_{is} = concentrazione dello standard interno nella soluzione B (4.5.2)

$area_i$ = area (o altezza) del picco del trans-anetolo

$area_{is}$ = area (o altezza) del picco dello standard interno

RF_i è calcolato a partire dalle cinque iniezioni della soluzione C (4.5.4).

9.2. Analisi delle soluzioni utilizzate per controllare la linearità della risposta

Iniettare le soluzioni utilizzate per controllare la linearità della risposta (4.5.3).

9.3. Analisi del campione

Iniettare la soluzione del campione in analisi (8.2).

10. **Calcolo dei risultati**

La formula per calcolare la concentrazione del trans-anetolo è la seguente:

ci = Cis * (area o altezzai/area o altezzais) * RFi

dove:

c_i = concentrazione del trans-anetolo nel campione in analisi

▼M1

C_{is} = concentrazione dello standard interno nel campione in analisi (4.5.2)

area o altezza$_i$ = area o altezza del picco del trans-anetolo

area o altezza$_{is}$ = area o altezza del picco dello standard interno

RF_i = fattore di risposta (calcolato come indicato al punto 9.1)

La concentrazione del trans-anetolo è espressa in grammi per litro, con una cifra decimale.

11. **Verifica e controllo della qualità**

I cromatogrammi devono essere tali che l'anetolo e lo standard interno siano separati l'uno dall'altro e da eventuali sostanze che possano interferire. Il valore di RF_i si calcola dai risultati delle cinque iniezioni della soluzione C (4.5.4). Se il coefficiente di variazione [CV % = (deviazione dallo standard/media)*100] è compreso entro il ±1 %, il valore medio di RF_i è accettabile.

Questo calcolo dev'essere utilizzato per determinare la concentrazione di trans-anetolo nel campione utilizzato per il controllo di qualità, prelevato dalle soluzioni di controllo della linearità (4.5.3).

Se i risultati medi dell'analisi della soluzione di linearità scelta per il controllo interno della qualità sono compresi entro il ± 2,5 % dei loro valori teorici, i risultati dei campioni in analisi possono essere accettati.

12. **Trattamento di un campione di bevande spiritose contenente una quantità elevata di zuccheri e di un campione di liquore prima dell'analisi GC**

Estrazione dell'alcol da una bevanda spiritosa contenente una quantità elevata di zuccheri al fine di determinare la concentrazione di trans-anetolo utilizzando la gascromatografia capillare.

12.1. Principio

Ad un'aliquota del campione di liquore aggiungere lo standard interno, a una concentrazione simile a quella dell'analita (trans-anetolo) nel liquore. Aggiungere in seguito fosfato di sodio dodecaidrato e solfato di ammonio anidro. Agitare e refrigerare la miscela, lasciare formare due strati e rimuovere lo strato superiore di alcol. Prelevare un'aliquota di questo strato alcolico e diluirla con soluzione di etanolo al 54 % in vol. (4.4) (NB: non aggiungere standard interno in questa fase, poiché è stato già aggiunto prima dell'estrazione). La soluzione risultante è analizzata mediante gascromatografia.

12.2. Reagenti

Durante l'estrazione utilizzare soltanto reagenti di purezza superiore al 99 %.

12.2.1. Solfato di ammonio, anidro (CAS 7783-20-2)

12.2.2. Fosfato di sodio, bibasico, dodecaidrato (CAS 10039-32-4)

12.3. Apparecchiatura e materiali

Beute, imbuti separatori, frigorifero.

12.4. Procedura

12.4.1. Esame preliminare del campione per determinare l'eventuale presenza di estragolo

Per accertarsi che l'estragolo non sia naturalmente presente nel campione, eseguire un'estrazione in bianco (12.6.2) senza aggiunta di standard interno. Se l'estragolo è naturalmente presente, scegliere un altro standard interno.

12.4.2. Estrazione

Pipettare 5 ml di etanolo al 96 % in vol. (4.1) in una beuta, pesare nella stessa beuta 50 mg di standard interno (4.3) e aggiungere 50 ml del campione. Aggiungere 12 g di fosfato di ammonio anidro (12.2.1) e 8,6 g di fosfato di sodio bibasico dodecaidrato (12.2.2). Tappare la beuta.

Agitare la beuta per almeno 30 minuti. A questo scopo si può utilizzare un agitatore meccanico, ma non un agitatore magnetico rivestito

▼M1

di Teflon, in quanto il Teflon assorbirebbe parte dell'analita. Si noti che i sali aggiunti non si scioglieranno completamente.

Tenere la beuta tappata in un frigorifero a temperatura inferiore a 5 ºC, per almeno due ore.

Dopo questo tempo dovrebbero presentarsi due strati distinti di liquido e un residuo solido. Lo strato alcolico dovrebbe essere nettamente separato; in caso contrario, riporre la beuta in frigorifero fino a ottenere una separazione netta.

Prelevare allora attentamente un'aliquota (ad esempio 10 ml) senza smuovere lo strato acquoso, introdurla in una fiala color ambra e chiudere con cura.

12.4.3. Preparazione del campione estratto da analizzare

Lasciare che l'estratto (12.4.2) raggiunga la temperatura ambiente.

Pipettare 2 ml di soluzione dello strato alcolico del campione estratto a temperatura ambiente in un matraccio tarato da 20 ml; portare a volume con etanolo al 45 % in vol. (4.4) e miscelare accuratamente.

12.5. Determinazione

Seguire la procedura indicata al punto 8.5.

12.6. Espressione dei risultati

Utilizzare la seguente formula:

Ci=(mis/V) * (areai/areais) * RFi

dove:

m_{is} = peso dello standard interno (4.3) prelevato (12.4.2) (in milligrammi)

V = volume del campione non noto (50 ml)

RF_i = fattore di risposta (9.1)

$area_i$ = area del picco del trans-anetolo

$area_{is}$ = area del picco dello standard interno

Esprimere i risultati in g/l con una cifra decimale.

12.7. Verifica e controllo della qualità

Seguire la procedura indicata al punto 11.

13. **Efficienza del metodo (precisione)**

Risultati statistici delle prove interlaboratorio:

Le seguenti tabelle indicano i risultati per l'anetolo.

I risultati sono stati ottenuti da uno studio sull'efficienza del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale.

Anno della prova interlaboratorio	1998
Numero di laboratori	16
Numero di campioni	10
Analita	anetolo

Pastis:

Campioni	A	B	C	D	E	F
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	15	15	15	13	16	16
Numero di risultati aberranti (laboratori)	1	1	1	3	—	—
Numero di risultati accettati	30	30	30	26	16	16
Media in g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Deviazione standard della ripetibilità (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—

▼**M1**

Campioni	A	B	C	D	E	F
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Limite di ripetibilità (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Deviazione standard della riproducibilità (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limite di riproducibilità (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Tipi di campione:

A Pastis; in doppio cieco

B Pastis; in doppio cieco

C Pastis; in doppio cieco

D Pastis; in doppio cieco

E Pastis; campione unico

F Pastis; campione unico

Altre bevande spiritose all'anice:

Campioni	G	H	I	J
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	16	14	14	14
Numero di risultati aberranti (laboratori)	—	2	1	1
Numero di risultati accettati	32	28	28	28
Media in g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Deviazione standard della ripetibilità (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Limite di ripetibilità (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Deviazione standard della riproducibilità (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limite di riproducibilità (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Tipi di campione:

G Ouzo; frazione (*)

H Anice; in doppio cieco

I Liquori all'anice; in doppio

J Liquori all'anice; in doppio

▼M1

VI. ACIDO GLICIRRIZICO. DETERMINAZIONE DELL'ACIDO GLICIRRIZICO PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI

1. **Campo di applicazione**

Il metodo consente la determinazione dell'acido glicirrizico nelle bevande spiritose all'anice mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Il regolamento (CEE) n. 1576/89 precisa che una bevanda spiritosa con la denominazione «Pastis» deve presentare un tenore di acido glicirrizico compreso tra 0,05 g/l e 0,5 g/l.

2. **Riferimenti normativi**

ISO 3696: 1987 Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova

3. **Principio**

Il tenore di acido glicirrizico è determinato mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelazione nell'UV. Una soluzione di calibrazione e il campione sono filtrati e iniettati direttamente, separatamente, nel sistema HPLC.

4. **Reagenti**

Per l'analisi utilizzare soltanto reagenti di classe HPLC, etanolo assoluto e acqua di classe 3 quali definiti in ISO 3696.

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

4.2. Glicirrizinato monoammonico, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$(acido glicirrizico e sale ammonico)

Massa molecolare: 839,98 (CAS 53956-04-0): purezza non inferiore al 90 %.

Massa molecolare dell'acido glicirrizico: 822,94

4.3. Acido acetico glaciale, CH_3COOH (CAS 64-19-7)

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

4.5. Etanolo, 50 % vol.

Per 1 000 ml a 20 ºC:

— etanolo, 96 % vol. (4.1): 521 ml

— acqua (2.0): 511 ml

4.6. Preparazione delle soluzioni di eluizione per l'analisi per HPLC

4.6.1. Solvente di eluizione A (a titolo di esempio)

80 parti in volume d'acqua (2.0)

20 parti in volume di acido acetico (4.3).

Degasare il solvente di eluizione per 5 minuti.

Nota: Se l'acqua utilizzata non è microfiltrata, è opportuno filtrare il solvente di eluizione mediante un filtro per solventi organici con diametro dei pori non superiore a 0,45 µm.

4.6.2. Solvente di eluizione B

Metanolo (4.4)

4.7. Preparazione delle soluzioni di calibrazione

Ripreparare tutte le soluzioni di taratura dopo due mesi.

4.7.1. Soluzione di riferimento C

Pesare 25 mg di glicirrizinato monoammonico (4.2), con un'approssimazione di 0,1 mg, in un matraccio tarato da 100 ml. Aggiungere etanolo al 50 % in vol. (4.5) e sciogliere il glicirrizinato monoammonico; portare poi a volume con etanolo al 50 % in vol. (4.5).

Filtrare con un filtro per solventi organici.

▼M1

4.7.2. Soluzioni utilizzate per controllare la linearità della risposta degli strumenti

Una soluzione madre di 1,0 g/l è preparata pesando, con un'approssimazione di 0,1 mg, 100 mg di glicirrizinato monoammonico in un matracio tarato da 100 ml. Aggiungere etanolo 50 % vol (4.5) e sciogliere il glicirrizinato monoammonico; portare poi a volume con etanolo 50 % vol (4.5).

Almeno altre 4 soluzioni corrispondenti a 0,05, 0,1, 0,25 e 0,5 g/l di glicirrizinato monoammonico vengono preparate: prelevare 5 ml, 10 ml, 25 ml e 50 ml della soluzione madre a 1,0 g/l e pipettarle separatamente in matracci tarati da 100 ml; portare a volume con etanolo 50 % vol. (4.5); miscelare accuratamente.

Filtrare con un filtro per solventi organici.

5. **Apparecchiature e materiali**

5.1. Sistema di separazione.

5.1.1. Cromatografo liquido ad alte prestazioni.

5.1.2. Sistema di pompaggio che permetta di ottenere e mantenere un flusso costante o programmato con elevata precisione.

5.1.3. Sistema di rivelazione per spettrofotometria nell'UV da regolare su una lunghezza d'onda di 254 nm.

5.1.4. Sistema di degasaggio dei solventi.

5.2. Integratore calcolatore o registratore compatibili con il sistema cromatografico disponibile.

5.3. Colonna (a titolo d'esempio):

Materiale: acciaio inossidabile o vetro

Diametro interno: 4-5 mm

Lunghezza: 100-250 mm

Fase stazionaria: silice innestata con gruppi funzionali ottadecilenici (C18) a granulometria preferibilmente sferica non superiore a 5 μm.

5.4. Materiale da laboratorio

5.4.1. Bilancia da laboratorio, precisione: 0,1 mg.

5.4.2. Vetreria tarata di classe A.

5.4.3. Dispositivo di filtrazione per piccoli volumi su micromembrana.

6. **Condizioni cromatografiche**

6.1. Caratteristiche di eluizione (a titolo d'esempio):

— Flusso dell'eluente: 1 ml/minuto

— Solvente A = 30 %

— Solvente B = 70 %

6.2. Rivelazione

— Lunghezza d'onda = 254 nm.

7. **Procedimento**

7.1. Preparazione del campione di bevanda spiritosa.

Filtrare se necessario attraverso un filtro per solventi organici (diametro pori: 0,45 μm).

7.2. Determinazione

Dopo stabilizzazione delle condizioni cromatografiche:

— iniettare 20 μl della soluzione di riferimento C (4.7.1),

— iniettare 20 μl del campione da analizzare,

— confrontare i due cromatogrammi ottenuti. Identificare i picchi dell'acido glicirrizico in base al loro tempo di ritenzione; misurarne l'area (o l'altezza) e calcolare la sua concentrazione in g/l con due cifre decimali, servendosi della relazione:

▼**M1**

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

dove:

c = concentrazione dell'acido glicirrizico, in grammi per litro, nella bevanda spiritosa analizzata

C = concentrazione di glicirrizinato monoammonico, in grammi per litro, nella soluzione di riferimento

H = area (o altezza) del picco dell'acido glicirrizico della soluzione di riferimento

h = area (o altezza) del picco dell'acido glicirrizico della bevanda spiritosa analizzata

P = purezza del glicirrizinato monoammonico, standard di riferimento (in %)

823 = massa molare dell'acido glicirrizico

840 = massa molare del glicirrizinato monoammonico.

8. **Efficienza del metodo (precisione)**

Risultati statistici delle prove interlaboratorio:

Le seguenti tabelle indicano i risultati relativi all'acido glicirrizico.

I risultati sono stati ottenuti da uno studio sull'efficienza del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale.

Anno della prova interlaboratorio	1998
Numero di laboratori	16
Numero di campioni	5
Analita	acido glicirrizico

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	13	14	15	16	16
Numero di risultati aberranti (laboratori)	3	2	1	—	—
Numero di risultati accettati	26	28	30	32	32
Media in g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Deviazione standard della ripetibilità (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Limite di ripetibilità (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Deviazione standard della riproducibilità (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Limite di riproducibilità (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Tipi di campione:

A Pastis; in doppio cieco

B Pastis; frazione (*)

C Pastis; in doppio cieco

D Pastis; in doppio cieco

E Pastis; in doppio cieco

▼M1

VII. CALCONI. METODO PER LA VERIFICA DELLA PRESENZA DI CALCONI NEI PASTIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI

1. **Campo di applicazione**

Il metodo consente di determinare se siano presenti o meno calconi nelle bevande all'anice. I calconi sono sostanze coloranti naturali della famiglia dei flavonoidi, presenti nel legno di liquirizia *(Glycyrrhiza glabra*).

In base al regolamento (CEE) n. 1576/89, per poter essere denominata «pastis» una bevanda spiritosa all'anice deve contenere calconi.

2. **Riferimenti normativi**

ISO 3696:1987 Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova.

3. **Principio**

Preparare una soluzione di estratto di liquirizia di riferimento. La presenza o l'assenza di calconi è determinata mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelazione nell'UV.

4. **Reagenti**

Durante l'analisi, utilizzare soltanto reagenti di qualità HPLC, etanolo al 96 % in vol. e acqua almeno di classe 3, quale definita da ISO 3696.

4.1. Etanolo, 96 % in vol. (CAS 64-17-5)

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

4.3. Sostanza di riferimento: *Glycyrrhiza glabra*: liquirizia, «legno dolce»

Legno di liquirizia (*Glycyrrhiza Glabra*) grossolanamente macinato. Dimensione media delle particelle di tipo a «bastoncello»: lunghezza 10-15 cm, spessore 1-3 mm.

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

4.5. Acido acetico glaciale, CH_3COOH (CAS 64-19-7)

4.6. Preparazione delle soluzioni

4.6.1. Etanolo, 50 % in vol.

Per 1 000 ml, miscelare, a 20 ºC:

— etanolo, 96 % in vol. (4.1): 521 ml

— acqua (2.0): 511 ml.

4.6.2. Solvente A: acetonitrile

Acetonitrile (4.2) di purezza analitica HPLC.

Degasare.

4.6.3. Solvente B: 0,1 ml di soluzione tampone di acetato di sodio a pH 4,66

Pesare 8,203 g di acetato di sodio (4.4), aggiungere 6,005 g di acido acetico glaciale (4.5) e portare a 1 000 ml con acqua (2) in un matraccio tarato.

5. **Preparazione dell'estratto di riferimento di *Glycyrrhiza glabra* (4.3)**

5.1. Pesare 10 g di legno di liquirizia (*Glycyrrhiza glabra*) macinato (4.3) e introdurli in un pallone di distillazione.

— Aggiungere 100 ml di etanolo al 50 % in vol. (4.6.1).

— Bollire a ricadere per un'ora.

— Filtrare.

— Conservare il filtrato ottenuto.

5.2. Recuperare dal filtro la liquirizia estratta

— Porre in un pallone di distillazione.

— Aggiungere 100 ml di etanolo al 50 % in vol. (4.6.1).

▼M1

— Bollire a ricadere per un'ora.

— Filtrare. Conservare il filtrato ottenuto.

5.3. L'estrazione del legno di liquirizia deve essere effettuata per tre volte successive.

5.4. Riunire i tre filtrati.

5.5. Evaporare il solvente (5.4) con un evaporatore di tipo rotativo.

5.6. Riprendere l'estratto residuo (5.5) mediante 100 ml di etanolo al 50 % in vol. (4.6.1).

6. **Apparecchiature e materiali**

6.1. Sistema di separazione.

6.1.1. Cromatografo liquido ad alte prestazioni.

6.1.2. Sistema di pompaggio che permetta di ottenere e mantenere una portata costante o programmata dei solventi, con elevata precisione.

6.1.3. Rivelatore spettrofotometrico UV/visibile, regolabile sulle lunghezze d'onda 254 e 370 nm.

6.1.4. Sistema di degasaggio dei solventi.

6.1.5. Forno della colonna regolabile alla temperatura di 40 ± 0,1 ºC.

6.2. Integratore calcolatore o registratore compatibili con la strumentazione disponibile.

6.3. Colonna:

Materiale: acciaio inossidabile o vetro

Diametro interno: 4-5 mm

Fase stazionaria: silice innestata con gruppi funzionali ottadecilenici (C18), con granulometria, preferibilmente sferica, di 5 μm (fase legata).

6.4. Normale materiale da laboratorio, comprendente:

6.4.1. Bilancia analitica (precisione: ± 0,1 mg).

6.4.2. Apparecchio di distillazione a ricadere dotato ad, esempio:

— di un pallone da 250 ml con collo smerigliato normalizzato,

— di un refrigerante a ricadere della lunghezza di 30 cm,

— di un dispositivo di riscaldamento (usare un dispositivo appropriato per evitare una eventuale pirolisi del materiale estrattivo).

6.4.3. Apparecchio di evaporazione di tipo rotativo.

6.4.4. Dispositivo di filtrazione (per esempio imbuto di Büchner).

6.5. Condizioni cromatografiche (a titolo di esempio)

6.5.1. Caratteristiche di eluizione dei solventi A (4.6.2) e B (4.6.3):

— gradiente da 20/80 (v/v) a 50/50 (v/v) in 15 minuti;

— gradiente da 50/50 (v/v) a 75/25 (v/v) in 5 minuti;

— isocratica a 75/25 (v/v) per 5 minuti;

— stabilizzazione della colonna tra due iniezioni:

— isocratica 20/80 (v/v) per 5 minuti.

6.5.2. Flusso dell'eluente: 1 ml/minuto.

6.5.3. Regolazione del rivelatore UV:

il rivelatore dev'essere regolato a 370 nm per rivelare la presenza di calconi e poi a 254 nm per rivelare l'acido glicirrizico.

Nota: il cambiamento di lunghezza d'onda (da 370 a 254 nm) dev'essere effettuato 30 secondi prima dell'inizio del picco di eluizione dell'acido glicirrizico.

7. **Procedimento**

7.1. Preparazione del campione di bevanda spiritosa.

Filtrare attraverso un filtro per solventi organici (diametro pori: 0,45 μm).

▼M1

7.2. Preparazione del residuo di estratto di liquirizia (5.6).

Preparare una diluizione 1:10 con etanolo 50 % vol (4.6.1) prima dell'analisi.

7.3. Determinazione

7.3.1. Iniettare 20 µl dell'estratto di liquirizia preparato (7.2). Effettuare l'analisi nelle condizioni cromatografiche precedentemente descritte (6.5).

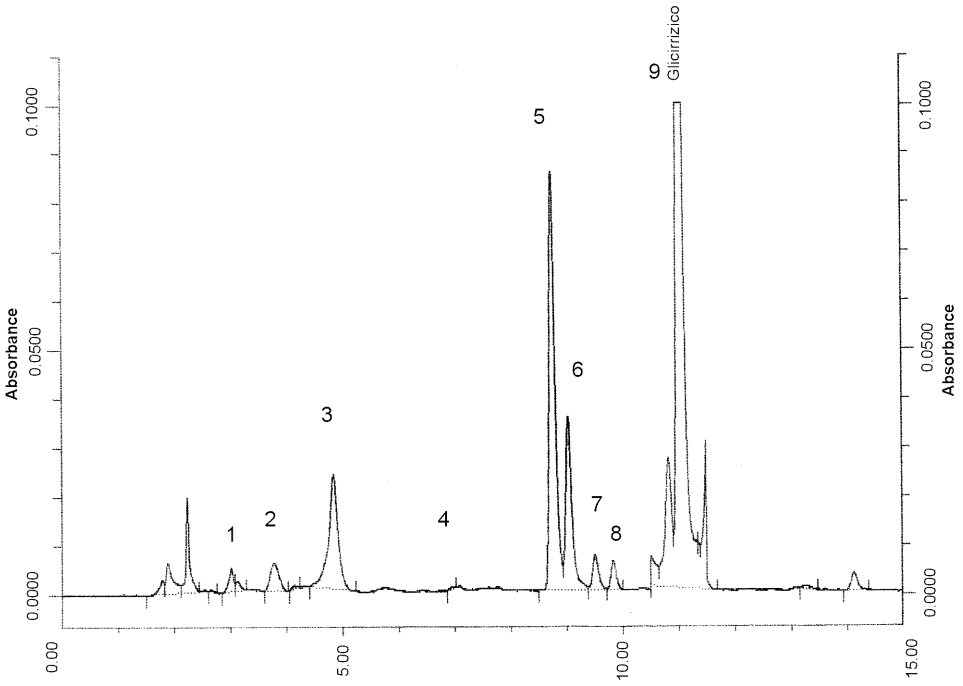
7.3.2. Iniettare 20 µl del campione (7.1) di bevanda spiritosa all'anice. Effettuare l'analisi nelle condizioni cromatografiche precedentemente descritte (6.5).

7.3.3. Confrontare i due cromatogrammi. Si deve ottenere una forte rassomiglianza dei due cromatogrammi nella zona di uscita dei calconi (durante la rivelazione a 370 nm, nelle condizioni d'analisi precedentemente descritte) (cfr. figura 1).

8. **Cromatogramma per un pastis**

Figura 1

Cromatogramma ottenuto con il metodo descritto sopra, da cui risulta la presenza di calconi in un pastis«. I picchi 1-8 corrispondono a calconi e il picco 9 all'acido glicirrizico.»



9. **Efficienza del metodo (precisione)**

Risultati delle prove interlaboratorio:

nella seguente tabella sono riportati i risultati dell'esame per l'accertamento della presenza o dell'assenza di calconi nel pastis e in bevande spiritose all'anice.

I risultati sono stati ottenuti da uno studio sull'efficienza del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale.

Anno della prova interlaboratorio	1998
Numero di laboratori	14
Numero di campioni	11
Analiti	calconi

▼**M1**

Campioni	A	B	C	D	E	F
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	14	14	14	14	14	13
N. di risultati aberranti (laboratori)	—	—	—	—	—	1 (*)
Numero di risultati accettati	28	14	14	28	28	26
Numero di risultati «presenza» di calconi	28	14	14	0	28	0
Numero di risultati «assenza» di calconi	0	0	0	28	0	26
Percentuale di risultati corretti (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Risultati delle due ripetizioni incoerenti tra loro, attribuiti a un errore di campionamento.

Campioni	G	H	I	J	K
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	14	14	14	14	14
N. di risultati aberranti (laboratori)	—	—	—	—	—
Numero di risultati accettati	28	14	14	28	28
Numero di risultati «presenza» di calconi	0	0	0	0	0
Numero di risultati «assenza» di calconi	28	14	14	28	28
Percentuale di risultati corretti (%)	100	100	100	100	100

Tipi di campione:

A Pastis; in doppio cieco

B Pastis; campione unico

C Pastis; campione unico

D «Pastis» (non contenente calconi); in doppio cieco

E «Pastis» (non contenente calconi); in doppio cieco

F Liquore all'anice (non contenente calconi); in doppio cieco

G Liquore all'anice (non contenente calconi); in doppio cieco

H Ouzo (non contenente calconi); campione unico

I Ouzo (non contenente calconi); campione unico

J Anice (non contenente calconi); in doppio cieco

K «Pastis» (non contenente calconi); in doppio cieco

▼M1

IX. GIALLO D'UOVO. DETERMINAZIONE DEL TENORE DI GIALLO D'UOVO NELLE BEVANDE SPIRITOSE — METODO FOTOMETRICO

1. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione di un tenore di giallo d'uovo compreso tra 40 e 250 g/l nei liquori all'uovo e nei liquori a base di uovo.

2. Riferimenti normativi

ISO 3696:1897 Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova

3. Principio

I composti fosforati solubili in etanolo presenti nel giallo d'uovo vengono estratti e determinati per via spettrofotometrica sotto forma di complesso fosfo-molibdico.

4. Reagenti

4.1. Acqua bidistillata.

4.2. Farina di infusori.

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

4.4. Soluzione di acetato di magnesio al 15 % (CAS 16674-78-5).

4.5. Acido solforico 10 % (CAS 7664-93-9).

4.6. Acido solforico 1N.

4.7. Soluzione di diidrogenofosfato di potassio a 0,16 g/l (CAS 778-77-0), KH_2PO_4.

4.8. Reattivo per la determinazione dei fosfati

Sciogliere 20 g di molibdato d'ammonio (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, in 400 ml d'acqua a 50 ºC.

In un altro recipiente, sciogliere 1 g di vanadato d'ammonio (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3, in 300 ml d'acqua calda e aggiungere, dopo raffreddamento, 140 ml di acido nitrico concentrato (CAS 7697-37-2). Le soluzioni raffreddate vengono riunite in un matraccio tarato da 1 000 ml e portate a volume.

5. Apparecchiature e materiali

5.1. Beuta da 100 ml.

5.2. Bagno a ultrasuoni (o agitatore magnetico).

5.3. Matraccio tarato da 100 ml.

5.4. Bagnomaria a 20 ºC.

5.5. Filtro (Whatman n. 4 o equivalente).

5.6. Capsula di porcellana (o di platino).

5.7. Bagnomaria bollente.

5.8. Piastra riscaldante.

5.9. Forno a muffola.

5.10. Matraccio tarato da 50 ml.

5.11. Matraccio tarato da 20 ml.

5.12. Spettrofotometro regolato a 420 nm.

5.13. Vaschetta da 1 cm.

6. Campioni

I campioni vengono conservati a temperatura ambiente fino al momento dell'analisi.

▼M1

7. **Modo di operare**

7.1. Preparazione del campione

7.1.1. Pesare 10 g di campione in una beuta da 100 ml (5.1).

7.1.2. Aggiungere 70 ml di etanolo poco alla volta in piccole porzioni, miscelando dopo ogni aggiunta, e porre in un bagno a ultrasuoni (5.2) per 15 minuti, oppure agitare la miscela con un agitatore magnetico (5.2) per 10 minuti a temperatura ambiente.

7.1.3. Trasferire il contenuto della beuta in un matraccio tarato da 100 ml (5.3) risciacquando con etanolo (4.3). Portare a volume con etanolo (4.3) e porre i matracci in bagnomaria a 20 ºC (5.4). Portare a volume a 20 ºC.

7.1.4. Dopo l'aggiunta di una piccola quantità di farina di infusori (4.2) filtrare (5.5) scartando i primi 20 ml.

7.1.5. Trasferire 25 ml di filtrato in un crogiolo di porcellana (o di platino). Concentrare questo filtrato per evaporazione lenta in un bagnomaria bollente (5.7) con l'aggiunta di 5 ml di una soluzione di acetato di magnesio al 15 % (4.4).

7.1.6. Porre le capsule su una piastra riscaldante (5.8) e riscaldare fino ad ottenere un residuo secco.

7.1.7. Incenerire il residuo riscaldandolo fino a incandescenza a 600 ºC in un forno a muffola (5.9) finché le ceneri sono bianche, per un tempo minimo di un'ora e mezzo, che si può protrarre anche per una notte.

7.1.8. Riprendere le ceneri con 10 ml di acido solforico 10 % (4.5) e trasferirle risciacquando con acqua distillata (4.1), in un matraccio tarato da 50 ml (5.10); portare a segno a temperatura ambiente, con acqua distillata (4.1). Un'aliquota di 5 ml di questa soluzione delle ceneri viene utilizzata per la determinazione fotometrica dei fosfati.

7.2. Determinazione fotometrica dei fosfati.

7.2.1. Soluzione di confronto.

7.2.1.1. Introdurre 10 ml di acido solforico 10 % (4.5) in un matraccio tarato da 50 ml (5.10) e riempire fino alla tacca con acqua distillata (4.1).

7.2.1.2. In un matraccio tarato da 20 ml (5.11), aggiungere ad un'aliquota di 5 ml di questa soluzione (7.2.1.1) 1 ml di acido solforico 1N (4.6) e 2 ml di reagente dei fosfati (4.8) e portare a 20 ml con acqua distillata (4.1).

7.2.1.3. Chiudere con un tappo non serrato ermeticamente, agitare e riscaldare per 10 minuti in bagnomaria bollente (5.7), poi raffreddare per 20 minuti in un bagnomaria a 20 ºC (5.4).

7.2.1.4. Riempire una cuvetta da 1 cm (5.13) con questa soluzione di confronto.

7.2.2. Soluzione campione

7.2.2.1. In un matraccio tarato da 20 ml (5.11) aggiungere ad un'aliquota di 5 ml delle ceneri (7.1.8) 1 ml di acido solforico 1N (4.6) e 2 ml di reagente dei fosfati (4.8) e portare a 20 ml con acqua distillata (4.1).

7.2.2.2. Chiudere con un tappo non serrato ermeticamente, agitare e riscaldare per 10 minuti in bagnomaria bollente (5.7), poi raffreddare per 20 minuti in un bagnomaria a 20 ºC (5.4).

7.2.2.3. La soluzione gialla formatasi viene immediatamente analizzata con uno spettrofotometro (5.12) a 420 nm in una cuvetta da 1 cm (5.13), in rapporto alla soluzione di confronto (7.2.1.4).

7.2.3. Curva di calibrazione

7.2.3.1. Per determinare la curva di calibrazione, inserire aliquote da 20 ml di reagente dei fosfati (4.8) in matracci tarati da 20 ml (5.11) contenenti ciascuno 1 ml di acido solforico 1N (4.6) e volumi rispettivamente di 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ml della soluzione di diidrogenofosfato di potassio (4.7), e portare a 20 ml con acqua distillata (4.1).

7.2.3.2. Chiudere con un tappo non serrato ermeticamente e riscaldare per 10 minuti in bagnomaria bollente (5.7), poi raffreddare per 20 minuti in un bagnomaria a 20 ºC (5.4) ed eseguire la determinazione fotometrica (5.12) in una cuvetta da 1 cm (5.13) a 420 nm in rapporto alla soluzione di confronto (7.2.1.4).

7.2.3.3. Costruzione della curva di calibrazione:

▼**M1**

soluzione di diidrogenofosfato (ml)	0	2	4	6	8	10
P_2O_5 (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. **Espressione dei risultati**

Il tenore di giallo d'uovo in g/l viene calcolato con la relazione seguente:

$$\text{giallo d'uovo(g/l)} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{massa volumica}}{E/40}$$

dove:

110 =	fattore di conversione per il P_2O_5 totale in g in 100 g di giallo d'uovo
mg P_2O_5 =	valore determinato nel campione in base alla curva di calibrazione
massa volumica =	massa volumica del liquore a base d'uovo a 20 ºC (g/ml)
E =	peso del liquore a base d'uovo, in g
40 =	fattore di diluizione dell'aliquota di 5 ml di soluzione di ceneri.

9. **Efficienza del metodo (precisione)**

Risultati statistici delle prove interlaboratorio:

la seguente tabella riporta i risultati di contenuto di giallo d'uovo, ottenuti da uno studio sull'efficienza del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale.

Anno della prova interlaboratorio:	1998
Numero di laboratori:	24
Numero di campioni:	5
Analita:	giallo d'uovo

Campioni	A	B	C	D	E
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	19	20	22	20	22
Numero di risultati aberranti (laboratori)	3	4	2	4	2
Numero di risultati accettati	38	40	44	40	44
Media	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Deviazione standard della ripetibilità (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Limite di ripetibilità (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Deviazione standard della riproducibilità (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Limite di riproducibilità (R) g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Tipi di campione:

A Advocaat; in doppio cieco

▼**M1**

B Advocaat in doppio cieco

C Advocaat, in doppio cieco

D Advocaat (diluito), frazione (*)

E Advocaat, in doppio cieco.