Tento dokument slouží výhradně k informačním účelům a nemá žádný právní účinek. Orgány a instituce Evropské unie nenesou za jeho obsah žádnou odpovědnost. Závazná znění příslušných právních předpisů, včetně jejich právních východisek a odůvodnění, jsou zveřejněna v Úředním věstníku Evropské unie a jsou k dispozici v databázi EUR-Lex. Tato úřední znění jsou přímo dostupná přes odkazy uvedené v tomto dokumentu

►**B**

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2870/2000

ze dne 19. prosince 2000,

kterým se stanoví referenční metody Společenství používané pro rozbor lihovin

(Úř. věst. L 333, 29.12.2000, s. 20)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
►**M1**	Nařízení Komise (ES) č. 2091/2002 ze dne 26. listopadu 2002	L 322	11	27.11.2002
►**M2**	Prováděcí nařízení Komise (EU) 2016/635 ze dne 22. dubna 2016	L 108	1	23.4.2016

Opraveno:

►**C1** Oprava, Úř. věst. L 277, 27.10.2017, s. 34 (2016/635)

▼B

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2870/2000

ze dne 19. prosince 2000,

kterým se stanoví referenční metody Společenství používané pro rozbor lihovin

Článek 1

Referenčními metodami Společenství, které se použijí pro rozbor lihovin a jimiž má být zajištěno dodržování nařízení (EHS) č. 1576/89 a nařízení (EHS) č. 1014/90

— při jakýchkoli úředních kontrolách nebo

— v případě sporu,

jsou metody uvedené v příloze tohoto nařízení.

Článek 2

Odchylně od čl. 1 první odrážky jsou jiné metody rozboru povoleny na odpovědnost vedoucího laboratoře za podmínky, že pokud jde o správnost a přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost), jsou tyto metody alespoň rovnocenné příslušným metodám rozboru uvedeným v příloze.

Článek 3

Nejsou-li pro kvalitativní a kvantitativní stanovení látek obsažených v určitých lihovinách stanoveny referenční metody Společenství používané pro rozbor, použijí se následující metody:

a) metody rozboru, které jsou validovány podle uznaných mezinárodních postupů, a zejména splňují kritéria uvedená v příloze směrnice 85/591/EHS;

b) metody rozboru, které splňují doporučené normy Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO);

c) metody rozboru uznané valným shromážděním Mezinárodního úřadu pro révu a víno (OIV) a zveřejněné tímto úřadem;

d) nejsou-li z důvodu správnosti, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti k dispozici metody uvedené v písmenech a), b) nebo c),

   — metody rozboru schválené dotyčným členským státem,

   — v případě potřeby jiné vhodné metody rozboru.

Článek 4

Pro účely tohoto nařízení se

a) „mezí opakovatelnosti“ rozumí hodnota, u níž lze s 95 % pravděpodobností předpokládat, že ji nepřekročí absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma výsledky zkoušek, které byly získány za stejných podmínek opakovatelnosti (tentýž pracovník, totéž zařízení, tatáž laboratoř, krátké časové rozmezí mezi stanoveními) {ISO 3534-1};

▼B

b) „mezí reprodukovatelnosti“ rozumí hodnota, u níž lze s 95 % pravděpodobností předpokládat, že ji nepřekročí absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma výsledky zkoušek, které byly získány za stejných podmínek reprodukovatelnosti (různí pracovníci, jiná zařízení a jiné laboratoře) {ISO 3534-1};

c) „správností“ rozumí těsnost souhlasu mezi jediným výsledkem měření a dohodnutou referenční hodnotou {ISO 3534-1}.

Článek 5

Toto nařízení vstupuje v platnost sedmým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Použije se ode dne 1. ledna 2001.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

▼B

PŘÍLOHA

POPIS REFERENČNÍCH METOD ROZBORU

I Stanovení obsahu alkoholu v % objemovýchDodatek I: Příprava destilátu

Dodatek II: Měření hustoty destilátu

— Metoda A = pyknometrie

— Metoda B = elektronická denzimetrie

— Metoda C = denzimetrie s použitím hydrostatických vah

II Stanovení celkového suchého extraktu gravimetricky

III Stanovení těkavých látek a methanolu

III.1 Obecné poznámky

III.2 Těkavé kongenery: aldehydy, vyšší alkoholy, ethyl-acetát a methanol (plynovou chromatografií)

III.3 Těkavé kyseliny ►M2 ——————— ◄

IV Kyselina kyanovodíková (p.m.)

V Anethol ►M1 ——————— ◄

VI Glycyrrhizová kyselina ►M1 ——————— ◄

VII Chalkony ►M1 ——————— ◄

VIII Celkové cukry ►M2 ——————— ◄

IX Vaječný žloutek ►M1 ——————— ◄

▼M2

X Stanovení složek dřeva: „furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanilin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, kyselina gallová, kyselina ellagová, kyselina vanilová, kyselina syringová a skopoletin“.

▼B

I. STANOVENÍ OBSAHU ALKOHOLU V % OBJEMOVÝCH V LIHOVINÁCH

Úvod

Referenční metoda obsahuje dva dodatky:

Dodatek I: Příprava destilátu

Dodatek II: Měření hustoty destilátu

1 Oblast použití

Metoda je vhodná pro stanovení skutečného obsahu alkoholu v % objemových v lihovinách.

2 Odkazy na normy

ISO 3696:1987: Voda pro použití v analytických laboratořích – Specifikace a zkušební metody.

3 Termíny a definice

3.1. Referenční teplota:

Referenční teplotou pro stanovení obsahu alkoholu v % objemových v lihovinách, hustoty a relativní hustoty lihovin je 20 °C.

Poznámka 1: Údaj „při *t* °C“ je vyhrazen pro všechna stanovení (hustoty nebo obsahu alkoholu v % objemových) vztažená k jiné teplotě než ke 20 °C.

3.2. Hustota:

Hustotou se rozumí poměr hmotnosti a objemu lihoviny ve vakuu při 20 °C. Vyjadřuje se v kg/m^3 a jejím symbolem je ρ_{20} °C nebo ρ_{20}.

3.3. Relativní hustota:

Relativní hustotou se rozumí poměr hustoty lihoviny při 20 °C a hustoty vody při téže teplotě, vyjádřený desetinným číslem. Označuje se symbolem *d*20 °C/20 °C nebo *d*20/20, nebo pouze *d*, nemůže-li dojít k záměně. Měřená veličina musí být v protokolu o rozboru uvedena pouze výše uvedenými symboly.

Poznámka 2: Relativní hustotu lze získat z hustoty ρ_{20} při 20 °C:

$\rho 20 = 998{,}203 \times d20/20$ nebo $d20/20 = \rho 20/998{,}203$

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

3.4. Skutečný obsah alkoholu v % objemových

Skutečný obsah alkoholu v % objemových v lihovině je roven počtu litrů ethanolu obsaženého ve 100 litrech směsi voda-alkohol, která má stejnou hustotu jako lihovina po destilaci. Referenční hodnoty obsahu alkoholu v % objemových při 20 °C pro hustoty různých směsí voda-alkohol při 20 °C, které mají být použity, jsou uvedeny v tabulce, kterou na mezinárodní úrovni přijala Mezinárodní organizace pro legální metrologii ve svém doporučení č. 22.

Obecná rovnice vztahu mezi obsahem alkoholu v %objemových a hustotou směsi voda-alkohol při dané teplotě je uvedena v příloze nařízení Komise (EHS) č. 2676/90 (Úř. věst. L 272, 3.10.1990, s. 1) na s. 40 v kapitole 3 „Obsah alkoholu v % objemových“ nebo v příručce metod rozboru úřadu OIV (1994) (s. 17).

▼B

Poznámka 3: U likérů a krémů, u nichž se přesný objem měří velmi obtížně, musí být vzorek zvážen a nejprve se určí obsah alkoholu vztažený na jednotku hmotnosti.

Přepočítávací vzorec:

$$\text{obsah alkoholu (obj. \%)} = \frac{\text{OAH (hmot. \%)} \times P_{20}\,(\text{vzorek})}{P_{20}\,(\text{alkohol})}$$

kde

OAH = obsah alkoholu v % hmotnostních

$\rho 20$ (alkohol) = 789,24 kg/m^3

4 **Podstata metody**

Po vydestilování se obsah alkoholu v % objemových stanoví pyknometricky, elektronickou denzimetrií nebo denzimetrií s použitím hydrostatických vah.

▼B

DODATEK I: PŘÍPRAVA DESTILÁTU

1 **Oblast použití**

Metoda je vhodná pro přípravu destilátu, který má být použit ke stanovení skutečného obsahu alkoholu v % objemových v lihovinách.

2 **Podstata metody**

Lihoviny se destilují za účelem oddělení ethanolu a jiných těkavých složek od extrakčního zbytku (látek, které nedestilují).

3 **Reakční činidla a materiál**

3.1. Varná tělíska.

3.2. Koncentrovaná odpěňovací emulze (pro krémové likéry).

4 **Přístroje a vybavení**

Obvyklé laboratorní přístroje, a zejména:

4.1. Vodní lázeň nastavitelná na 10 až 15 °C.

Vodní lázeň nastavitelná na (20 ± 2) °C.

4.2. Odměrné baňky třídy přesnosti A na 100 ml a 200 ml s přípustnou odchylkou 0,1 % a 0,15 %.

4.3. Destilační aparatura:

4.3.1. Obecné požadavkyDestilační aparatura musí odpovídat následujícím specifikacím:

— počet spojení musí být omezen na nezbytné minimum, aby byla zajištěna těsnost systému,

— musí být zařazeno zařízení k omezení pěnění (strhávání vroucí kapaliny parami) a k regulaci rychlosti destilace par bohatých na alkohol,

— rychlá a úplná kondenzace alkoholových par,

— jímání prvních destilačních frakcí do vodného prostředí.

Zdroj tepla musí být opatřen vhodným prvkem pro rozložení tepla, aby nedošlo k pyrogenní reakci v destilovaném materiálu.

4.3.2. Na obrázku 1 je uveden příklad vhodné destilační aparatury, která se skládá z následujících částí:

— destilační baňka s kulatým dnem na 1 litr, s normalizovaným zábrusem,

— rektifikační kolona o výšce nejméně 20 cm (například Vigreux),

— destilační přestupník opatřený přibližně 10 cm rovným chladičem (typu West),

— spirálový chladič o délce 40 cm,

— destilační předloha pro odvádění destilátu na dno kónické jímací baňky obsahující malé množství vody.

Poznámka: Popsaná aparatura je určena pro vzorky o objemu nejméně 200 ml. Vzorky o menším objemu (100 ml) mohou být destilovány s použitím menší destilační baňky a za předpokladu, že bude použit destilační přestupník proti rozstřikávání nebo jiné zařízení proti strhávání kapaliny.

▼B

5 **Uchovávání zkušebních vzorků**

Vzorky se před rozborem uchovávají při laboratorní teplotě.

6 **Postup**

Předběžná poznámka:

Destilaci lze provádět také postupem zveřejněným unií IUPAC (1968).

6.1 Přezkoušení destilační aparatury.

Aparatura musí mít následující vlastnosti:

při destilaci 200 ml směsi voda-alkohol o známé koncentraci blízké 50 % obj. nesmí dojít ke ztrátám alkoholu vyšším než 0,1 % obj.

6.2 Lihoviny o obsahu alkoholu nižším než 50 % obj.

Do odměrné baňky se odměří 200 ml lihoviny.

Zaznamená se teplota této kapaliny, nebo se vytemperuje na standardní teplotu (20 °C).

Vzorek se převede do destilační baňky destilační aparatury a odměrná baňka se třikrát vypláchne vždy 20 ml destilované vody. Oplachová voda se vždy přidá k obsahu destilační baňky.

Poznámka: Toto zředění 60 mililitry je dostatečné u lihovin obsahujících méně než 250 g suchého extraktu na litr. Jinak by pro zabránění pyrolýze musel objem oplachové vody při koncentraci suchého extraktu 300 g/l činit alespoň 70 ml, při koncentraci 400 g/l 85 ml a při koncentraci suchého extraktu 500 g/l 100 ml (u některých ovocných likérů nebo krémů). Pro různé objemy vzorků se tyto objemy odpovídajícím způsobem upraví.

Přidá se několik varných tělísek (3.1) (a odpěňovací emulze u krémových likérů).

Do původní odměrné baňky na 200 ml, do níž bude jímán destilát, se přidá 20 ml destilované vody. Tato baňka musí být poté umístěna do chladné vodní lázně (4.1) (o teplotě 10 až 15 °C u anýzových lihovin).

Za občasného míchání obsahu destilační baňky, aby nedošlo ke strhávání kapaliny nebo ke spékání, se destiluje, dokud hladina destilátu nevystoupí několik milimetrů pod rysku odměrné baňky.

Po ochlazení destilátu na původní teplotu kapaliny ± 0,5 °C se baňka doplní destilovanou vodou po rysku a obsah se důkladně promíchá.

Tento destilát se použije pro stanovení obsahu alkoholu v % objemových (dodatek II).

6.3 Lihoviny o obsahu alkoholu vyšším než 50 % obj.

Do odměrné baňky na 100 ml se odměří 100 ml lihoviny a obsah se převede do destilační baňky destilační aparatury.

Odměrná baňka se několikrát vypláchne destilovanou vodou a oplachová voda se přidá k obsahu destilační baňky. Použije se dostatečné množství vody, aby byla destilační baňka naplněna přibližně do 230 ml.

▼B

Do odměrné baňky na 200 ml, do níž bude jímán destilát, se přidá 20 ml destilované vody. Tato baňka musí být poté umístěna do chladné vodní lázně (4.1) (o teplotě 10 až 15 °C u anýzových lihovin).

Za občasného míchání obsahu destilační baňky se destiluje, dokud hladina destilátu nevystoupí několik milimetrů pod rysku 200ml odměrné baňky.

Po ochlazení destilátu na původní teplotu kapaliny ± 0,5 °C se baňka doplní destilovanou vodou po rysku a obsah se důkladně promíchá.

Tento destilát se použije pro stanovení obsahu alkoholu v % objemových (dodatek II).

Poznámka: Obsah alkoholu v % objemových v lihovině je dvakrát vyšší než obsah alkoholu v destilátu.

▼B

DODATEK II: MĚŘENÍ HUSTOTY DESTILÁTU

METODA A: STANOVENÍ SKUTEČNÉHO OBSAHU ALKOHOLU V % OBJEMOVÝCH V LIHOVINÁCH PYKNOMETRICKY

A.1 **Podstata metody**

Obsah alkoholu v % objemových se získá z hustoty destilátu stanovené pyknometricky.

A.2 **Reakční činidla a materiál**

Není-li uvedeno jinak, použijí se při rozboru pouze reakční činidla o čistotě p.a. a voda o čistotě alespoň 3 podle normy ISO 3696:1987.

A.2.1. Roztok chloridu sodného (2 % (*m*/*V*))

Pro přípravu 1 litru roztoku se odváží 20 g chloridu sodného a rozpustí se v 1 litru vody.

A.3 **Přístroje a vybavení**

Obvyklé laboratorní přístroje, a zejména:

A.3.1. Analytické váhy s přesností na 0,1 mg.

A.3.2. Teploměr se zábrusem, dělený na desetiny stupně v rozsahu 10 až 30 °C. Tento teploměr musí být úředně ověřen nebo kalibrován podle ověřeného teploměru.

A.3.3. Pyknometr o objemu přibližně 100 ml ze skla Pyrex opatřený odnímatelným teploměrem se zábrusem (A.3.2). Pyknometr má postranní kapiláru dlouhou 25 mm s vnitřním průměrem (maximálně) 1 mm, zakončenou kuželovitým zábrusem se zátkou. Podle potřeby mohou být použity jiné pyknometry podle ISO 3507, například pyknometr o objemu 50 ml.

A.3.4. Tárovací nádobka o stejném vnějším objemu jako pyknometr (s přesností na 1 ml) a o hmotnosti rovné hmotnosti pyknometru naplněného kapalinou o hustotě 1,01 (roztok chloridu sodného podle A.2.1).

A.3.5. Tepelně izolovaný plášť, přesně upravený na tvar pyknometru.

Poznámka 1: Metoda pro stanovení hustoty lihovin ve vakuu vyžaduje použití dvouramenných vah, pyknometru a tárovací nádobky o stejném vnějším objemu, aby se v každém okamžiku rušil účinek vztlaku vzduchu. Při této jednoduché technice mohou být použity jednoramenné váhy, pokud se tárovací nádobka dodatečně zváží, aby byly zohledněny změny vztlaku vzduchu.

A.4 **Postup**

Předběžné poznámky:

V této metodě je popsáno použití pyknometru o objemu 100 ml ke stanovení obsahu alkoholu; poskytuje nejsprávnější výsledky. Je však možné použít menší pyknometr, například o objemu 50 ml.

A.4.1. Kalibrace pyknometru

Kalibrace pyknometru sestává ze stanovení následujících parametrů:

— tára prázdného pyknometru,

— objem pyknometru při 20 °C,

— hmotnost pyknometru naplněného vodou při 20 °C.

▼B

A.4.1.1. Kalibrace pomocí jednoramenných vah:

Stanoví se:

— hmotnost čistého, suchého pyknometru (*P*),

— hmotnost pyknometru naplněného vodou při *t*°C (*P*1),

— hmotnost tárovací nádobky (*T*0).

A.4.1.1.1. Zváží se čistý, suchý pyknometr (*P*).

A.4.1.1.2. Pyknometr se opatrně naplní destilovanou vodou o laboratorní teplotě a osadí se teploměrem.

Pyknometr se pečlivě otře do sucha a umístí se do tepelně izolovaného pláště. Pyknometr v plášti se převrací, dokud není teplota na teploměru konstantní.

V postranní kapiláře pyknometru se nechá vystoupat voda až k hornímu okraji kapiláry. Přesně se odečte teplota a podle potřeby se koriguje na nepřesnost teplotní stupnice.

Pyknometr naplněný vodou se zváží (*P*1).

A.4.1.1.3. Zváží se tárovací nádobka (*T*0).

A.4.1.1.4. Výpočet

— Tára prázdného pyknometru = $P - m$

kde m je hmotnost vzduchu v pyknometru.

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

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

— Objem pyknometru při 20 °C:

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

kde *F*t je faktor pro teplotu *t* °C z tabulky I v kapitole 1 „Hustota a relativní hustota“ v příloze nařízení (EHS) č. 2676/90 (s. 10).

Hodnota *V*20 °C musí být známa s přesností na 0,001 ml.

— Hmotnost vody v pyknometru při 20 °C:

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

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

Poznámka 3: Podle potřeby lze použít hodnotu 0,99715 pro hustotu vody při normálním tlaku a obsah alkoholu lze vypočítat pro odpovídající hustotu na vzduchu odečtenou z tabulek úřadu HM Customs and Excise (Úřad pro cla a nepřímé daně).

A.4.1.2. Metoda kalibrace pomocí dvouramenných vah:

A.4.1.2.1. Tárovací nádobka se umístí na levou misku vah a čistý, suchý pyknometr s postranní kapilárou se zátkou na pravou misku vah. Váhy se vyváží závažím na misce s pyknometrem (*p* gramů).

▼B

A.4.1.2.2. Pyknometr se opatrně naplní destilovanou vodou o laboratorní teplotě a osadí se teploměrem. Pečlivě se otře do sucha a umístí se do tepelně izolovaného pláště. Pyknometr v plášti se převrací, dokud není teplota na teploměru konstantní.

V postranní kapiláře pyknometru se nechá voda vystoupat až přesně k hornímu okraji kapiláry. Postranní kapilára se osuší a uzavře se zátkou. Přesně se odečte teplota a podle potřeby se koriguje na nepřesnost teplotní stupnice.

Pyknometr naplněný vodou se zváží tak, že se váhy vyváží závažím na misce pyknometru (*p'* gramů).

A.4.1.2.3. Výpočet— Tára prázdného pyknometru = $p + m$
kde m je hmotnost vzduchu v pyknometru.

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

— Objem pyknometru při 20 °C

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

kde *F*t je faktor pro teplotu *t* °C z tabulky I v kapitole 1 „Hustota a relativní hustota“ v příloze nařízení (EHS) č. 2676/90 (s. 10).

Hodnota *V*20 °C musí být známa s přesností na 0,001 ml.

— Hmotnost vody v pyknometru při 20 °C:

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

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

A.4.2. Stanovení obsahu alkoholu ve zkušebním vzorku

A.4.2.1. Postup s použitím jednoramenných vah.

A.4.2.1.1. Zváží se tárovací nádobka, hmotnost *T1*.

A.4.2.1.2. Zváží se pyknometr s připraveným destilátem (viz dodatek I), hmotnost *P*2 při *t* °C.

A.4.2.1.3. Výpočet

— $dT = T1 - T0$

— Hmotnost prázdného pyknometru v okamžiku měření

$P - m + dT$

— Hmotnost kapaliny v pyknometru při *t* °C

$P2 - (P - m + dT)$

— Hustota při t °C v g/ml

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

— Hustota při *t* °C se vyjádří v kg/m^3, a to vynásobením ρt °C hodnotou 1 000, a označí se jako ρt.

Provede se korekce ρt na teplotu 20 °C pomocí tabulek hodnot ρT pro směsi voda-alkohol (tabulka II v dodatku II k příručce metod rozboru úřadu OIV (1994), s. 17–29).

▼B

V tabulce se v řádku s celočíselnou teplotou T, která je nejbližší naměřené teplotě t, vyhledá hustota, která je nejbližší vyšší k hustotě ρt.

Rozdíl nalezený v tabulce pod touto hodnotou se použije k výpočtu hustoty ρt lihoviny při této celočíselné teplotě *T*.

— V rámci řádku s touto celočíselnou teplotou se vypočte rozdíl mezi hustotou ρ‘, která je nejbližší vyšší k hodnotě ρt, a vypočtenou hustotou ρt. Tato diference se vydělí diferencí nalezenou v tabulce napravo od hustoty ρ‘. Podíl představuje desetinnou složku hodnoty obsahu alkoholu, přičemž celočíselná složka je uvedena v záhlaví sloupce, v němž je uvedena hodnota ρ‘ (obsah alkoholu se označí *D*t).

Poznámka 4: Při plnění je rovněž možné umístit pyknometr do vodní lázně o teplotě 20 ± 2 °C.

A.4.2.1.4. Výsledek

Skutečný obsah alkoholu s použitím hodnoty ρ20 se vypočte pomocí níže uvedených tabulek:

Tabulkou, v níž je uvedena hodnota obsahu alkoholu v % objemových při 20 °C jako funkce hustoty různých směsí voda-alkohol při 20 °C je tabulka, kterou na mezinárodní úrovni přijala Mezinárodní organizace pro legální metrologii ve svém doporučení č. 22.

A.4.2.2. Postup s použitím dvouramenných vah

A.4.2.2.1. Zváží se pyknometr s připraveným destilátem (viz dodatek I), hmotnost p'' při t °C.

A.4.2.2.2. Výpočet

— Hmotnost kapaliny v pyknometru při t °C

$$p + m - p''$$

— Hustota při t °C v g/ml

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

— Způsobem uvedeným výše pro postup s použitím jednoramenných vah se vyjádří hustota při t °C v kg/m^3 a pomocí tabulek se provede korekce ρt na teplotu 20 °C.

A.5 **Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)**

A.5.1. Statistické výsledky mezilaboratorního testu

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1,2].

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	20
Počet vzorků	6

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	19	20	17	19	19	17
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	1	—	2	1	1	3
Počet zahrnutých výsledků	38	40	34	38	38	34
Střední hodnota($\bar{x}$) (% obj.)	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51(*)			42,93(*)	45,73(*)	63,03(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) (% obj.)	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Mez opakovatelnosti (*r*) (% obj.)	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) (% obj.)	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Mez reprodukovatelnosti (*R*) (% obj.)	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Druhy vzorků
A Ovocný likér: rozdělená úroveň (*).
B Brandy: neoznačené duplikáty.
C Whisky: neoznačené duplikáty.
D Grappa: rozdělená úroveň (*).
E Akvavit: rozdělená úroveň (*).
F Rum: rozdělená úroveň (*).

METODA B: STANOVENÍ SKUTEČNÉHO OBSAHU ALKOHOLU V % OBJEMOVÝCH V LIHOVINÁCH – MĚŘENÍ ELEKTRONICKOU DENZIMETRIÍ (ZALOŽENOU NA REZONANČNÍM KMITOČTU OSCILÁTORU V OSCILAČNÍ KOMŮRCE)

B.1 **Podstata metody**

Hustota kapaliny se stanoví z elektronického měření kmitočtu kmitajícího oscilátoru ve tvaru U-trubice. Měření se provádí tak, že se vzorek přidá do oscilačního systému, jehož specifický oscilační kmitočet se přidáním látky změní.

B.2 **Reakční činidla a materiál**

Není-li uvedeno jinak, použijí se při rozboru pouze reakční činidla o čistotě p.a. a voda o čistotě alespoň 3 podle normy ISO 3696:1987.

B.2.1. Aceton (CAS 666-52-4) nebo čistý alkohol

B.2.2. Suchý vzduch.

B.3 **Přístroje a vybavení**

Obvyklé laboratorní přístroje, a zejména:

B.3.1. DigitálníDenzimetrElektronický denzimetr pro provádění takových měření musí udávat hustotu v g/ml s přesností na 5 desetinných míst.

▼B

Poznámka 1: Denzimetr musí být umístěn na naprosto stabilní podložce izolované od všech vibrací.

B.3.2. Regulace teploty

Účinnostní charakteristiky denzimetru jsou dodrženy pouze tehdy, je-li měřicí komůrka vybavena zabudovaným regulátorem teploty, který umožňuje udržovat stabilitu teploty ± 0,02 °C nebo lepší.

Poznámka 2: Přesné nastavení a sledování teploty v měřicí komůrce je velmi důležité, neboť chyba o velikosti 0,1 °C vede k odchylce v hustotě v řádu 0,1 kg/m^3.

B.3.3. Stříkačky pro nástřik vzorku nebo automatický dávkovač.

B.4 **Postup**

B.4.1. Kalibrace denzimetruPřed prvním použitím musí být přístroj nakalibrován podle pokynů výrobce. Kalibrace musí být pravidelně opakována a kontrolována pomocí certifikovaného referenčního standardu nebo vnitrolaboratorního referenčního roztoku navázaného na certifikovaný referenční standard.

B.4.2. Stanovení hustoty vzorku

B.4.2.1. Podle potřeby se měřicí komůrka před měřením vyčistí a zbaví vlhkosti acetonem nebo čistým alkoholem a nechá se vyschnout na vzduchu. Komůrka se vypláchne vzorkem.

B.4.2.2. Komůrka se zcela naplní vzorkem (pomocí stříkačky nebo automatického dávkovače). Při plnění se musí zajistit odstranění všech vzduchových bublin. Vzorek musí být homogenní a nesmí obsahovat žádné tuhé částice. Veškeré nerozpustné látky se před rozborem odstraní filtrací.

B.4.2.3. Poté, co se údaj ustálí, zaznamená se hustota $\rho 20$ nebo obsah alkoholu zobrazený na denzimetru.

B.4.3. Výsledek

Použije-li se hodnota $\rho 20$, vypočte se skutečný obsah alkoholu pomocí následujících tabulek:

Tabulkou, v níž je uvedena hodnota obsahu alkoholu v % objemových při 20 °C jako funkce hustoty různých směsí voda-alkohol při 20 °C, je tabulka, kterou na mezinárodní úrovni přijala Mezinárodní organizace pro legální metrologii ve svém doporučení č. 22.

B.5 **Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)**

B.5.1 Statistické výsledky mezilaboratorního testu

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1,2].

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	16
Počet vzorků	6

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	11	13	15	16	14	13
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	2	3	1	–	1	2

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet zahrnutých výsledků	22	26	30	32	28	26
Střední hodnota($\bar{x}$) (% obj.)	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52(*)			43,10(*)	45,91(*)	63,31(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) (% obj.)	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Mez opakovatelnosti (*r*) (% obj.)	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) (% obj.)	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Mez reprodukovatelnosti (*R*) (% obj.)	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Druhy vzorků
A Ovocný likér: rozdělená úroveň (*).
B Brandy: neoznačené duplikáty.
C Whisky: neoznačené duplikáty.
D Grappa: rozdělená úroveň (*).
E Akvavit: rozdělená úroveň (*).
F Rum: rozdělená úroveň (*).

METODA C: STANOVENÍ SKUTEČNÉHO OBSAHU ALKOHOLU V % OBJEMOVÝCH V LIHOVINÁCH – MĚŘENÍ DENZIMETRICKY S POUŽITÍM HYDROSTATICKÝCH VAH

C.1 **Podstata metody**

Obsah alkoholu v lihovinách se měří denzimetricky s použitím hydrostatických vah založených na Archimedově zákoně, podle něhož na těleso ponořené do kapaliny působí svisle vzhůru síla rovnající se tíze kapaliny vytlačené tělesem.

C.2 **Reakční činidla a materiál**

Není-li uvedeno jinak, použijí se při rozboru pouze reakční činidla o čistotě p.a. a voda o čistotě alespoň 3 podle normy ISO 3696:1987.

C.2.1. Roztok pro čištění plováku (hydroxid sodný, 30 % (*m*/*V*))

Pro přípravu 100 ml roztoku se odváží 30 g hydroxidu sodného a objem se doplní 96 % ethanolem.

C.3 **Přístroje a vybavení**

Obvyklé laboratorní přístroje, a zejména:

C.3.1. Jednoramenné hydrostatické váhy s citlivostí 1 mg.

C.3.2. Plovák o objemu nejméně 20 ml, speciálně upravený pro dané váhy, upevněný na vlákně o průměru menším než 0,1 mm.

C.3.3. Odměrný válec s ryskou. Musí být možné zcela ponořit plovák v objemu válce pod ryskou; z hladiny kapaliny smí vystupovat pouze vlákno. Vnitřní průměr válce musí být alespoň o 6 mm větší než průměr plováku.

▼B

C.3.4. Teploměr (nebo sonda) dělený po stupních a desetinách stupně od 10 do 40 °C, kalibrovaný s přesností na 0,05 °C.

C.3.5. Závaží ověřená metrologickým orgánem.

Poznámka 1: e možné použít rovněž dvouramenné váhy; podstata metody je popsána v kapitole 1 „Hustota a relativní hustota“ v příloze nařízení (EHS) č. 2676/90 (s. 7).

C.4 **Postup**

Plovák a odměrný válec se mezi jednotlivými měřeními očistí destilovanou vodou, vysuší měkkým laboratorním papírem, který neuvolňuje vlákna, a opláchnou se roztokem, jehož hustota má být stanovena. Měření musí být provedeno, jakmile se aparatura ustálí, aby se omezily ztráty alkoholu vypařováním.

C.4.1. Kalibrace vah

Ačkoliv mají váhy obvykle vnitřní kalibrační systém, musí hydrostatické váhy umožňovat kalibraci závažím ověřeným metrologickým orgánem.

C.4.2. Kalibrace plováku

C.4.2.1. Odměrný válec se při teplotě 15 až 25 °C, přednostně při 20 °C, naplní po rysku redestilovanou vodou (nebo vodou o ekvivalentní čistotě, např. mikrofiltrovanou vodou o vodivosti 18,2 MΩ/cm).

C.4.2.2. Plovák a teploměr se ponoří, zakrouží se jimi, a na přístroji se odečte hustota kapaliny; odečtená hodnota se podle potřeby koriguje tak, aby se rovnala hustotě vody při teplotě měření.

C.4.3. Kontrola s použitím roztoku voda–alkohol

C.4.3.1. Odměrný válec se při teplotě 15 až 25 °C, přednostně při 20 °C, naplní po rysku směsí voda-alkohol o známém obsahu alkoholu.

C.4.3.2. Plovák a teploměr se ponoří, zakrouží se jimi, a na přístroji se odečte hustota kapaliny (nebo obsah alkoholu, je-li to možné); takto zjištěný obsah alkoholu se musí rovnat předtím stanovenému obsahu alkoholu.

Poznámka 2: Tento roztok o známém obsahu alkoholu lze použít ke kalibraci namísto redestilované vody.

C.4.4. Měření hustoty destilátu (nebo jeho obsahu alkoholu, pokud to přístroj umožňuje)

C.4.4.1. Měřený vzorek se nalije do odměrného válce po rysku.

C.4.4.2. Plovák a teploměr se ponoří, zakrouží se jimi, a na přístroji se odečte hustota kapaliny (nebo obsah alkoholu, je-li to možné); měří-li se hustota při teplotě t °C, (ρt), zaznamená se teplota.

C.4.4.3. Provede se korekce ρt na teplotu 20 °C pomocí tabulek hodnot ρT pro směsi voda-alkohol (tabulka II v dodatku II k příručce metod rozboru úřadu OIV (1994), s. 17–29).

C.4.5. Čištění plováku a odměrného válce

C.4.5.1. Plovák se ponoří do čisticího roztoku v odměrném válci.

▼B

C.4.5.2. Plovák se ponechá namočený jednu hodinu a pravidelně se jím otáčí.

C.4.5.3. Opláchne se velkým množství tekoucí vody a poté destilovanou vodou.

C.4.5.4. Vysuší se měkkým laboratorním papírem, který neuvolňuje vlákna.

Tento postup se provede při prvním použití plováku a poté se provádí podle potřeby pravidelně.

C.4.6. Výsledek

Skutečný obsah alkoholu s použitím hodnoty $\rho 20$ se vypočte pomocí níže uvedených tabulek.

Tabulkou, v níž je uvedena hodnota obsahu alkoholu v % objemových při 20 °C jako funkce hustoty různých směsí voda-alkohol při 20 °C je tabulka, kterou na mezinárodní úrovni přijala Mezinárodní organizace pro legální metrologii ve svém doporučení č. 22.

C.5 **Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)**

C.5.1. Statistické výsledky mezilaboratorního testu

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1,2].

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	12
Počet vzorků	6

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	12	10	11	12	11	9
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	–	2	1	–	1	2
Počet zahrnutých výsledků	24	20	22	24	22	18
Střední hodnota($\bar{x}$) (% obj.)	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51(*)			43,09(*)	45,89(*)	63,44(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) (obj. %)	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Mez opakovatelnosti (*r*) (obj. %)	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) (obj. %)	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Mez reprodukovatelnosti (*R*) (obj. %)	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Druhy vzorků

A Ovocný likér: rozdělená úroveň (*).

B Brandy: neoznačené duplikáty.

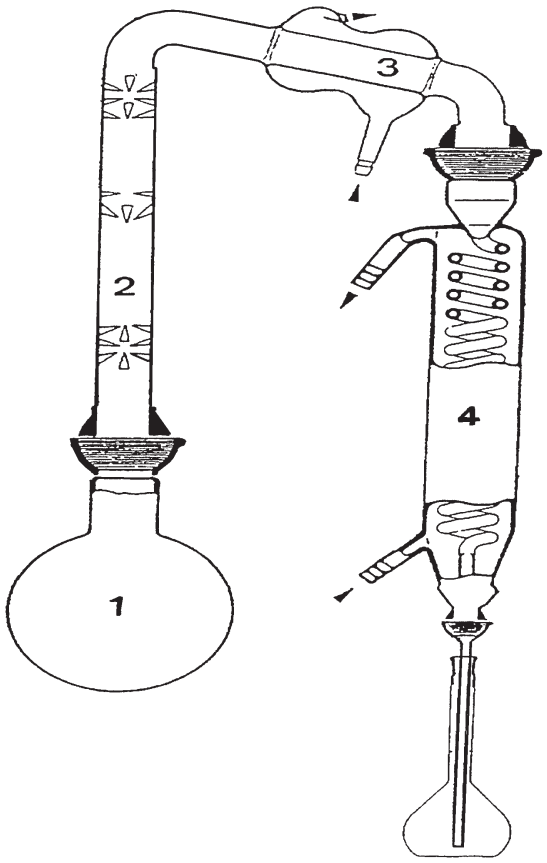
C Whisky: neoznačené duplikáty.

D Grappa: rozdělená úroveň (*).

E Akvavit: rozdělená úroveň (*).

F Rum: rozdělená úroveň (*).

▼B



Obrázek 1. Destilační aparatura pro měření skutečného obsahu alkoholu v % objemových v lihovinách

1. 1. Destilační baňka s kulatým dnem na 1 litr, s normalizovaným zábrusem.

2. Rektifikační kolona o výšce 20 cm (typ Vigreux).

3. 10 cm rovný chladič (typ West).

4. 40 cm spirálový chladič.

▼B

II. STANOVENÍ CELKOVÉHO SUCHÉHO EXTRAKTU LIHOVIN GRAVIMETRICKY

1 Oblast použití

V souladu s nařízením (EHS) č. 1576/89 se předpokládá použití této metody pouze u akvavitu, u něhož je suchý extrakt omezen do hodnoty 15 g/l.

2 Odkazy na normy

ISO 3696:1987: Voda pro použití v analytických laboratořích – Specifikace a zkušební metody.

3 Definice

Celkový suchý extrakt nebo celková suchá hmota zahrnuje veškerou hmotu, která je za daných fyzikálních podmínek netěkavá.

4 Podstata metody

Zváží se zbytek po odpaření lihoviny na vodní lázni a po vysušení v sušárně.

5 Přístroje a vybavení

5.1 Válcová odpařovací miska s rovným dnem o průměru 55 mm.

5.2 Vroucí vodní lázeň.

5.3 Pipeta na 25 ml třídy přesnosti A.

5.4 Laboratorní sušárna.

5.5 Exsikátor.

5.6 Analytické váhy s přesností na 0,1 mg.

6 Odběr vzorků a vzorky

Vzorky se před rozborem uchovávají při laboratorní teplotě.

7 Postup

7.1 Do předem zvážené válcové odpařovací misky s rovným dnem o průměru 55 mm se pipetou odměří 25 ml lihoviny obsahující méně než 15 g sušiny na litr. Během první hodiny odpařování se odpařovací miska umístí na víko vroucí vodní lázně, aby kapalina nevřela, neboť by to mohlo vést ke ztrátám při rozstřikování. Poté se miska ponechá další hodinu v bezprostředním kontaktu s párou vodní lázně.

7.2 Sušení se dokončí tak, že se odpařovací miska umístí na dvě hodiny do sušárny při 105 ± 3 °C. Odpařovací miska se nechá vychladnout v exsikátoru a společně s obsahem se zváží.

8 Výpočet

Hmotnost zbytku vynásobená 40 se rovná hmotnosti suchého extraktu v lihovině a vyjádří se v g/l s přesností na jedno desetinné místo.

9 Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)

9.1 Statistické výsledky mezilaboratorního testu

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1,2].

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	10
Počet vzorků	4

▼B

Vzorky	A	B	C	D
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	9	9	8	9
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	1	1	2	–
Počet zahrnutých výsledků	18	18	16	18
Střední hodnota($\bar{\times}$) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Mez opakovatelnosti (*r*) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Mez reprodukovatelnosti (*R*) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Druhy vzorků

A Brandy: neoznačené duplikáty.

B Rum: rozdělená úroveň.

C Grappa: rozdělená úroveň

D Akvavit: rozdělená úroveň

▼B

III. STANOVENÍ TĚKAVÝCH LÁTEK A METHANOLU V LIHOVINÁCH

III.1 OBECNÉ POZNÁMKY

1 **Definice**

V nařízení (EHS) č. 1576/89 se stanoví minimální obsah těkavých látek jiných než ethanol a methanol u řady lihovin (u rumu, pěstitelské vínovice, ovocných destilátů atd.). Pouze u těchto lihovin se tímto obsahem obvykle rozumí součet koncentrací:

1. těkavých kyselin vyjádřených jako octová kyselina;

2. aldehydů vyjádřených jako ethanal součtem ethanalu (acetaldehydu) a ethanalového podílu v 1,1-diethoxyethanu (acetalu);

3. následujících vyšších alkoholů: propan-1-olu, butan-1-olu, butan-2-olu, 2-methylpropan-1-olu stanovených jednotlivě a dále 2-methylbutan-1-olu a 3-methybutan-1-olu stanovených jednotlivě nebo jako součet obou;

4. ethyl-acetátu.

Obvyklými metodami stanovení těkavých látek jsou tyto metody:

— těkavé kyseliny stanovením celkové kyselosti těkavých kyselin,

— aldehydy (ethanal a acetal), ethyl-acetát a alkoholy plynovou chromatografií (GPC).

2 **Rozbor těkavých látek plynovou chromatografií**

Stanovení jiných než výše uvedených těkavých látek plynovou chromatografií může být zajímavé jako způsob stanovení jak původu suroviny použité při destilaci, tak podmínek destilace.

Některé lihoviny obsahují jiné těkavé látky, jako jsou aromatické složky, které jsou charakteristické pro surovinu použitou pro získání alkoholu, pro aroma lihoviny a pro zvláštní charakter přípravy lihoviny. Tyto složky jsou důležité pro posouzení požadavků stanovených v nařízení (EHS) č. 1576/89.

III.2 STANOVENÍ TĚKAVÝCH KONGENERŮ PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ: ALDEHYDY, VYŠŠÍ ALKOHOLY, ETHYL-ACETÁT A METHANOL

1 **Oblast použití**

Tato metoda je vhodná pro stanovení 1,1-diethoxyethanu (acetalu), 2-methylbutan-1-olu (aktivního amylalkoholu), 3-methylbutan-1-olu (isoamylalkoholu), methanolu (methylalkoholu), ethyl-ethanoátu (ethyl-acetátu), butan-1-olu (n-butanolu), butan-2-olu (*sek*-butan-1-olu), 2-methylpropan-1-olu (isobutylalkoholu), propan-1-olu (n-propanolu) a ethanalu (acetaldehydu) v lihovinách plynovou chromatografií. Metoda používá vnitřní standard, například pentan-3-ol. Koncentrace těchto analytů se vyjadřuje v gramech na 100 litrů čistého alkoholu; před rozborem musí být stanoven obsah alkoholu ve výrobku. Mezi lihoviny, jejichž rozbor může být proveden touto metodou, patří whisky, brandy, rum, vínovice, ovocný destilát a matolinová pálenka.

2 **Odkazy na normy**

ISO 3696:1987: Voda pro použití v analytických laboratořích – Specifikace a zkušební metody.

▼B

3 **Definice**

Kongenery se rozumějí těkavé látky, které vznikají spolu s ethanolem při kvašení, destilaci a zrání lihovin.

4 **Podstata metody**

Kongenery v lihovinách se stanoví přímým nástřikem lihoviny, nebo vhodně naředěné lihoviny, do systému plynového chromatografu (GC). Před nástřikem se do lihoviny přidá vhodný vnitřní standard. Kongenery se separují při teplotním programu na vhodné koloně a detekují se plamenově-ionizačním detektorem (FID). Koncentrace každého z kongenerů se stanoví proti vnitřnímu standardu z odezvových faktorů, které se získají při kalibraci za stejných chromatografických podmínek, jako jsou podmínky při rozboru lihoviny.

5 **Reakční činidla a materiál**

Není-li uvedeno jinak, použijí se pouze reakční činidla o certifikované čistotě vyšší než 97 %, zakoupená u dodavatele s certifikátem ISO, která při zkušebním zředění neobsahují jiné kongenery (to lze potvrdit nástřikem jednotlivých standardů kongenerů při zkušebním zředění za chromatografických podmínek podle bodu 6.4), a voda výhradně o čistotě alespoň 3, jak je definována v normě ISO 3696. Acetal a acetaldehyd musí být uchovávány v temnu při méně než 5 °C, všechna ostatní reakční činidla mohou být uchovávána při laboratorní teplotě.

5.1 Čistý ethanol (CAS 64-17-5).

5.2 Methanol (CAS 67-56-1).

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

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

5.5 Vhodné vnitřní standardy: pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-methylpentan-1-ol (CAS 629-89-1) nebo methyl-nonanoát (CAS 1731-84-6).

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

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

5.8 Ethyl-acetát (CAS 141-78-6).

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

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

5.11 Acetaldehyd (CAS 75-07-0).

5.12 Acetal (1,1-diethoxyethan) (CAS 105-57-7).

5.13 Roztok ethanolu, 40 % (V/V)

Pro přípravu roztoku ethanolu o koncentraci 400 ml/l se 400 ml ethanolu (5.1) odměří do odměrné baňky na 1 litr, doplní se po rysku destilovanou vodou a promíchá se.

5.14 Příprava a uchovávání standardních roztoků (postup pro validovanou metodu)

Všechny standardní roztoky musí být uchovávány při teplotě nižší než 5 °C a musí být každý měsíc čerstvě připraveny. Hmotnosti složek a roztoků musí být zaznamenány s přesností na 0,1 mg.

5.14.1 Standardní roztok – A

Následující reakční činidla se odměří pipetou do odměrné baňky na 100 ml obsahující 60 ml roztoku ethanolu (5.13) pro minimalizaci vypařování, objem se doplní po rysku roztokem ethanolu (5.13) a důkladně promíchá. Zaznamená se hmotnost baňky, každé přidané složky a celková konečná hmotnost obsahu.

▼B

Složka	Objem (ml)
Methanol (5.2)	3,0
Propan-1-ol (5.3)	3,0
2-methylpropan-1-ol (5.4)	3,0
2-methylbutan-1-ol (5.6)	3,0
3-methylbutan-1-ol (5.7)	3,0
Ethyl-acetát (5.8)	3,0
Butan-1-ol (5.9)	3,0
Butan-2-ol (5.10)	3,0
Acetaldehyd (5.11)	3,0
Acetal (1,1-diethoxyethan) (5.12)	3,0

Poznámka 1: Je vhodné přidat acetal a acetaldehyd jako poslední, aby se minimalizovaly ztráty vypařováním.

5.14.2 Standardní roztok – B

Do odměrné baňky na 100 ml obsahující přibližně 80 ml roztoku ethanolu (5.13) se pipetou odměří 3 ml pentan-3-olu nebo jiného vhodného vnitřního standardu (5.5), objem se doplní po rysku roztokem ethanolu (5.13) a důkladně se promíchá.

Zaznamená se hmotnost baňky, hmotnost pentan-3-olu nebo jiného vnitřního standardu a celková konečná hmotnost obsahu.

5.14.3 Standardní roztok – C

Do odměrné baňky na 100 ml obsahující přibližně 80 ml roztoku ethanolu (5.13) se pipetou odměří 1 ml roztoku A (5.14.1) a 1 ml roztoku B (5.14.2), objem se doplní po rysku roztokem ethanolu (5.13) a důkladně se promíchá.

Zaznamená se hmotnost baňky, každé přidané složky a celková konečná hmotnost obsahu.

5.14.4 Standardní roztok – D

Pro zabezpečení kontinuity rozboru se s použitím dříve připraveného standardu A (5.14.1) připraví standard pro řízení jakosti (QC). Do odměrné baňky na 100 ml obsahující přibližně 80 ml roztoku ethanolu (5.13) se pipetou odměří 1 ml roztoku A (5.14.1), objem se doplní po rysku roztokem ethanolu (5.13) a důkladně promíchá.

Zaznamená se hmotnost baňky, každé přidané složky a celková konečná hmotnost obsahu.

5.14.5 Standardní roztok – E

Do odměrné baňky na 100 ml obsahující přibližně 80 ml roztoku ethanolu (5.13) se pipetou odměří 10 ml roztoku B (5.14.2), objem se doplní po rysku roztokem ethanolu (5.13) a důkladně se promíchá.

Zaznamená se hmotnost baňky, každé přidané složky a celková konečná hmotnost obsahu.

5.14.6 Standardní roztoky pro kontrolu linearity odezvy plamenově-ionizačního detektoru (FID)

Do samostatných odměrných baněk na 100 ml obsahujících přibližně 80 ml roztoku ethanolu (5.13) se pipetou odměří 0, 0,1, 0,5, 1,0 a 2,0 ml roztoku A (5.14.1) a 1,0 ml roztoku B (5.14.2), objem se doplní po rysku roztokem ethanolu (5.13) a důkladně se promíchá.

Zaznamená se hmotnost baňky, každé přidané složky a celková konečná hmotnost obsahu.

▼B

5.14.7 Standardní roztok pro řízení jakosti (QC)

Do navažovací baňky se pipetou odměří 9 ml standardního roztoku D (5.14.4) a 1 ml standardního roztoku E (5.14.5) a obsah se důkladně se promíchá.

Zaznamená se hmotnost navažovací baňky, každé přidané složky a celková konečná hmotnost obsahu.

6 **Přístroje a vybavení**

6.1 Zařízení pro stanovení hustoty a obsahu alkoholu.

6.2 Analytické váhy s přesností na 0,1 mg.

6.3 Plynový chromatograf s možností teplotního programování, vybavený plamenově-ionizačním detektorem a integrátorem nebo jiným zařízením pro zpracování dat, které umožňuje měřit plochy píků nebo výšky píků.

6.4 Kolona (kolony) pro plynovou chromatografii, umožňující takovou separaci analytů, aby bylo rozlišení jednotlivých složek (kromě 2-methylbutan-1-olu a 3-methylbutan-1-olu) alespoň 1,3.

Poznámka 2: Vhodné jsou následující příklady kolon a chromatografických podmínek:

1. Retenční prázdná předkolona 1 m × 0,32 mm (vnitřní průměr), spojená s kolonou CP-WAX 57 CB 50 m × 0,32 mm (vnitřní průměr), tloušťka vrstvy 0,2 μm (stabilizovaný polyethylenglykol) napojenou na kolonu Carbowax 400 50 m × 0,32 mm (vnitřní průměr), tloušťka vrstvy 0,2 μm (kolony jsou spojeny press-fit konektory).

Nosný plyn a tlak:	Helium (135 kPa)
Teplota kolony:	35 °C po dobu 17 min., nárůst 12 °C/min do 70 °C, prodleva 25 min. při 70 °C
Teplota nástřiku:	150 °C
Teplota detektoru:	250 °C
Nastřikovaný objem:	1 μl, dělicí poměr (split) 20 až 100:1

2. Retenční prázdná předkolona 1 m × 0,32 mm (vnitřní průměr), spojená s kolonou CP-WAX 57 CB 50 m × 0,32 mm (vnitřní průměr), tloušťka vrstvy 0,2 μm (stabilizovaný polyethylenglykol) (Retenční prázdná předkolona je napojena press-fit konektorem).

Nosný plyn a tlak:	helium (65 kPa)
Teplota kolony:	35 °C po dobu 10 min., nárůst 5 °C/min do 110 °C, nárůst 30 °C/min od 110 do 190 °C, prodleva 2 min. 190 °C
Teplota nástřiku:	260 °C
Teplota detektoru	300 °C
Nastřikovaný objem:	1 μl dělicí poměr (split) 55:1

▼B

3. Plněná kolona (5 % CW 20M, Carbopack B), 2 m × 2 mm (vnitřní průměr)

Teplota kolony:	65 °C po dobu 4 min., nárůst 10 °C/min do 140 °C, prodleva 5 min. při 140 °C, nárůst 5 °C/min do 150 °C, prodleva 3 min. při 150 °C
Teplota nástřiku:	65 °C
Teplota v detektoru:	200 °C
Nastřikovaný objem:	1 µl

7 **Odběr vzorků a vzorky**

7.1 Laboratorní vzorek

Po obdržení se u každého vzorku změří obsah alkoholu (6.1).

8 **Postup (pro validovanou metodu)**

8.1 Zkušební vzorek

8.1.1 Zváží se vhodná uzavíratelná navažovací baňka a hmotnost se zaznamená.

8.1.2 Do navažovací baňky se pipetou odměří 9 ml laboratorního vzorku a hmotnost se zaznamená (M_{VZOREK}).

8.1.3 Přidá se 1 ml standardního roztoku E (5.14.5) a hmotnost se zaznamená (*M*VS).

8.1.4 Zkušební vzorek se důkladně protřepe (alespoň 20krát se převrátí). Vzorky se musí před rozborem uchovávat při teplotě nižší než 5 °C, aby se minimalizovaly ztráty těkáním.

8.2 Slepý pokus

8.2.1 Na vahách s přesností na 0,1 mg (6.2) se zváží vhodně těsně uzavřená navažovací baňka a hmotnost se zaznamená.

8.2.2 Do navažovací baňky se pipetou odměří 9 ml roztoku ethanolu (5.13) o koncentraci 400 ml/l a hmotnost se zaznamená.

8.2.3 Přidá se 1 ml standardního roztoku E (5.14.5) a hmotnost se zaznamená.

8.2.4 Zkušební materiál se prudce protřepe (alespoň 20krát se převrátí). Vzorky musí být před rozborem uchovávány při méně než 5 °C, aby se minimalizovaly ztráty těkáním.

8.3 Předběžná zkouška

Provede se nástřik standardního roztoku C (5.14.3), aby bylo jisté, že dojde k separaci všech analytů s minimálním rozlišením 1,3 (kromě 2-methylbutan-1-olu a 3-methylbutan-1-olu).

8.4 Kalibrace

Kalibrace se zkontroluje následujícím postupem. Každý ze standardních roztoků (5.14.6) obsahujících vnitřní standard (VS) se analyzuje třikrát po sobě pro potvrzení linearity odezvy. Pro každý nástřik se z integrátoru odečtou plochy nebo výšky píků, vypočte se poměr *R* pro každý kongener a sestrojí se graf závislosti hodnot *R* na poměru koncentrací

▼B

kongeneru a vnitřního standardu (VS) *C*. Výsledkem by měla být lineární závislost s korelačním koeficientem alespoň 0,99.

$$R = \frac{\text{Plocha nebo výška píku kongeneru}}{\text{Plocha nebo výška píku VS}}$$

$$C = \frac{\text{Koncentrace kongeneru } (\mu g / g)}{\text{Koncentrace VS } (\mu g / g)}$$

8.5 Stanovení

Provede se nástřik standardního roztoku C (5.14.3) a dvou standardních roztoků pro řízení jakosti (QC) (5.14.7). Následně se nastříknou neznámé vzorky (připravené podle bodů 8.1 a 8.2), přičemž se po každých 10 vzorcích nastříkne jeden standard pro řízení jakosti (QC) pro potvrzení stability rozboru. Po každých 5 vzorcích se nastříkne standardní roztok C (5.14.3).

9 **Výpočet**

Za předpokladu, že lze údaje zkontrolovat způsobem popsaným v dále uvedené metodě, lze použít automatizovaný systém zpracování dat.
Měří se buď plochy píků, nebo výšky píků kongeneru a vnitřního standardu.

9.1 Výpočet odezvového faktoru

Z chromatogramu po nástřiku standardního roztoku C (5.14.3) se pomocí rovnice (1) vypočítají odezvové faktory pro každý kongener.

$$1)\ \text{Odezvový faktor} = \frac{\text{Plocha nebo výška píku VS}}{\text{Plocha nebo výška píku kongeneru}} \times \frac{\text{Konc. kongeneru } (\mu g / g)}{\text{Konc. VS } (\mu g / g)}$$

kde

VS = vnitřní standard

Konc. Kongeneru = koncentrace kongeneru v roztoku C (5.14.3)

Konc. VS = koncentrace vnitřního standardu v roztoku (5.14.3).

9.1.2 Rozbor vzorku

Koncentrace každého kongeneru ve vzorcích se vypočte z následující rovnice (2).

2)

$$2)\ \text{Konc. kongeneru } (\mu g/g) = \frac{\text{Plocha nebo výška píku kongeneru}}{\text{Plocha nebo výška píku VS}} \times \frac{M_{VS}\,(g)}{M_{VZOREK}\,(g)} \times \text{Konc. VS}\,(\mu g / g) \times RF$$

kde

M_{VZOREK} = hmotnost vzorku (8.12);

M_{VS} = hmotnost vnitřního standardu (8.1.3);

Konc. VS = koncentrace vnitřního standardu v roztoku E (5.14.5);

RF = odezvový faktor vypočtený z rovnice 1.

▼B

9.1.3 Rozbor standardního roztoku pro řízení jakosti (QC)

Pomocí dále uvedené rovnice (3) se vypočte výtěžnost pro každý kongener ve standardech pro řízení jakosti (QC), vyjádřený v procentech předpokládané hodnoty.

$$3)\ \text{Výtěžek vzorku pro QC v \%} = \frac{\text{Konc. analytu ve standardu pro QC}}{\text{Koncentrace analytu v roztoku D}} \times 100$$

Koncentrace analytu ve standardu pro řízení jakosti (QC) se vypočte pomocí výše uvedených rovnic (1) a (2).

9.2 Konečné vyjádření výsledků

Výsledky se přepočítají z µg/g na gramy na 100 ml čistého alkoholu ve vzorku pomocí rovnice (4):

Koncentracia v g na liter ab solutneho alkoholu =

Konc. 10/(koncentrac.(% × 1 000) kde ρ = hustota v kg/m^3.

Výsledky se vyjádří na 3 platné číslice a maximálně jedno desetinné místo, např. 11,4 g na 100 litrů čistého alkoholu.

10 **Zabezpečení a řízení jakosti (pro validovanou metodu)**

Pomocí výše uvedené rovnice (2) se vypočte koncentrace každého kongeneru v roztocích pro řízení jakosti připravených postupem podle bodů 8.1.1 až 8.1.4. Pomocí rovnice (3) se vypočte výtěžnost v procentech předpokládané hodnoty. Leží-li dosažené výsledky pro každý kongener v rozmezí ± 10 % jejich teoretické hodnoty, je možné v rozboru pokračovat. V opačném případě by měla být vyšetřena příčina nesprávného výsledku a učiněny příslušné kroky k nápravě.

11 **Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)**

Statistické výsledky mezilaboratorního testu: v následující tabulce jsou uvedeny hodnoty pro tyto sloučeniny: ethanal, ethyl-acetát, acetal (1,1-diethoxyethan), celkový ethanal, methanol, butan-2-ol, propan-1-ol, butan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, 2-methylbutan-3-ol, 3-methylbutan-1-ol.

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1,2].

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	ethanal

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	28	26	27	27	28
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	2	4	3	3	2

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých výsledků	56	52	54	54	56
Střední hodnota($\bar{x}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4	28,6
				13,8(*)	52,2(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*Sr*) µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSDr*) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*SR*) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSDR*) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D Whisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	ethyl-acetát

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	24	24	25	24	24
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	2	2	1	2	2
Počet zahrnutých výsledků	48	48	50	48	48
Střední hodnota($\bar{x}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5	99,1
				91,8(*)	117,0(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*Sr*) µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSDr*) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*SR*) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSDR*) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D Whisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

▼B

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	acetal

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	20	21	22	17	21
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	4	3	2	4	3
Počet zahrnutých výsledků	40	42	44	34	42
Střední hodnota($\bar{x}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36	15,1
				6,60(*)	28,3(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D Whisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	celkový ethanal

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	23	19	22	21	22
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	1	5	2	3	2
Počet zahrnutých výsledků	46	38	44	42	44
Střední hodnota($\bar{x}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4	32,7
				15,8(*)	61,8(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D Whisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	methanol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	26	27	27	28	25
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	4	3	3	1	4
Počet zahrnutých výsledků	52	54	54	56	50
Střední hodnota($\bar{\times}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0	18,6
				61,5(*)	28,9(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D Whisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	4
Analyt	butan-2-ol

▼B

Vzorky	A	B	C	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	21	27	29	22
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	4	3	1	3
Počet zahrnutých výsledků	42	54	58	44
Střední hodnota($\bar{x}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
E Rum: rozdělená úroveň (*).

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	propan-1-ol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	29	27	27	29	29
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	2	4	3	2	2
Počet zahrnutých výsledků	58	54	54	58	58
Střední hodnota($\bar{x}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3(*)	177,1 222,1(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D vWhisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	butan-1-ol

Vzorky	A	B	C
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	20	22	22
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	4	4	6
Počet zahrnutých výsledků	40	44	44
Střední hodnota($\bar{\times}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) µg/g	0,43	0,20	0,43
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	11,2	3,6	5,6
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	1,1	0,6	1,2
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	15,7	9,8	10,8
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	1,7	1,5	2,3

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty. (*).

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	2-methylpropan-1-ol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	28	31	30	26	25
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	3	0	1	5	6
Počet zahrnutých výsledků	56	62	60	52	50

▼B

Vzorky	A	B	C	D	E
střední hodnota($\bar{x}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8(*)	133,87(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D Whisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	2-methylbutan-1-ol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	25	26	25	27	25
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	3	2	3	1	2
Počet zahrnutých výsledků	50	52	50	54	50
Střední hodnota($\bar{x}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1	39,5
				45,2(*)	61,5(*)
Směrodatná odchylka opakovatelnosti (*S*r) µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Směrodatná odchylka za podmínek reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Relativní směrodatná odchylka za podmínek reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D Whisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

▼B

Rok provedení mezilaboratorního testu	1997
Počet laboratoří	32
Počet vzorků	5
Analyt	3-methylbutan-1-ol

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	23	23	24	27	21
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	5	5	4	1	6
Počet zahrnutých výsledků	46	46	48	54	42
Střední hodnota ($\bar{x}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4(*)	212,3 245,6(*)
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Mez opakovatelnosti (*r*) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Mez reprodukovatelnosti (*R*) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Druhy vzorků
A Brandy: neoznačené duplikáty.
B Kirsch: neoznačené duplikáty.
C Grappa: neoznačené duplikáty.
D Whisky: rozdělená úroveň (*).
E Rum: rozdělená úroveň (*).

▼M2

III.3 STANOVENÍ TĚKAVÝCH KYSELIN V LIHOVINÁCH

1. **Oblast použití**

Tato metoda byla validována mezilaboratorní studií pro rum, brandy, matolinové a ovocné destiláty s obsahem od 30 mg/l do 641 mg/l.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987 Jakost vody pro analytické účely – Specifikace a zkušební metody

3. **Definice**

3.1. Obsah těkavých kyselin se vypočítá odečtením obsahu netěkavých kyselin od celkového obsahu kyselin.

3.2. Celkový obsah kyselin je součet titrovatelných kyselin.

3.3. Obsah netěkavých kyselin je tvořen zbytky po odpaření lihoviny do sucha.

4. **Podstata metody**

Celkový obsah kyselin a obsah netěkavých kyselin se určí titrací či potenciometrií.

5. **Reakční činidla a materiál**

Není-li uvedeno jinak, použijí se při rozboru pouze reakční činidla o čistotě p.a. a voda o čistotě alespoň 3 podle normy ISO 3696:1987.

▼C1

5.1. 0,01 M roztoku hydroxidu sodného (NaOH)

▼M2

5.2. Směsný indikátorový roztok:

Odváží se 0,1 g indigokarmínu a 0,1 g fenolové červeni.

Rozpustí se ve 40 ml vody a doplní se ethanolem na 100 ml.

6. **Přístroje a vybavení**

Laboratorní vybavení na nepřímé měření, laboratorní sklo třídy A a následující vybavení:

6.1. Vodní vývěva

6.2. Rotační odpařovač nebo ultrazvuková lázeň

6.3. Vybavení na potenciometrickou titraci (nepovinné)

7. **Odběr vzorků a vzorky**

Před rozborem se vzorky uchovávají při pokojové teplotě.

8. **Postup**

8.1. Celkový obsah kyselin

8.1.1. Příprava vzorku

V případě potřeby se lihovina ozáří ultrazvukovými vlnami (ultrasonikace) nebo se v případě potřeby míchá ve vakuu po dobu dvou minut, aby byla zbavena oxidu uhličitého.

8.1.2. Titrace

25 ml lihoviny se pipetou přenese do Erlenmeyerovy baňky o obsahu 500 ml.

Přidá se přibližně 200 ml zchlazené převařené destilované vody (čerstvě připravené každý den) a 2–6 kapek směsného indikátorového roztoku (5.2).

Titruje se s 0,01 M roztokem hydroxidu sodného (5.1), dokud se v případě bezbarvé lihoviny žlutozelená barva nezmění ve fialovou a v případě hnědě zbarvené lihoviny v červenohnědou.

Je rovněž možné provést potenciometrickou titraci do pH 7,5.

Nechť $n_{1\ ml}$ je objem 0,01 M přidaného roztoku hydroxidu sodného.

8.1.3. Výpočet

Celkový obsah kyselin (CK) vyjádřený v miliekvivalentech na litr lihoviny je $0{,}4 \times n_1$.

▼C1

Celkový obsah kyselin (CK') vyjádřený v mg kyseliny octové na litr lihoviny je $24 \times n_1$.

▼M2

8.2. Obsah netěkavých kyselin

8.2.1. Příprava vzorku

Nechá se odpařit 25 ml lihoviny do sucha:

25 ml lihoviny se přenese pipetou do válcové odpařovací misky o průměru 55 mm s rovným dnem. Během první hodiny odpařování je odpařovací miska umístěna na poklopu lázně s vařící vodou, aby se kapalina nevařila, protože by při vystříknutí mohlo dojít k jejím ztrátám.

Vzorek se dosuší umístěním odpařovací misky do sušárny při 105 °C na dvě hodiny. Odpařovací miska se nechá zchladnout v exsikátoru.

8.2.2. Titrace

Zbytek po odpařování se rozpustí pomocí zchlazené převařené destilované vody (čerstvě připravené každý den), doplňuje se až do objemu přibližně 100 ml a přidá se 2–6 kapek směsného indikátorového roztoku (5.2).

▼M2

Titruje se s 0,01 M roztokem hydroxidu sodného (5.1).

Je rovněž možné provést potenciometrickou titraci do pH 7,5.

Nechť $n_{2\ ml}$ je objem 0,01 M přidaného roztoku hydroxidu sodného.

8.2.3. Výpočet

Obsah netěkavých kyselin (NK) vyjádřený v miliekvivalentech na litr lihoviny je $0{,}4 \times n_2$.

Obsah netěkavých kyselin (NK) vyjádřený v mg kyseliny octové na litr lihoviny je $24 \times n_2$.

9. **Výpočet obsahu těkavých kyselin**

9.1. Vyjádřeno v miliekvivalentech na litr:

Nechť:

CK = celkový obsah kyselin v miliekvivalentech na litr

NK = obsah netěkavých kyselin v miliekvivalentech na litr

Obsah těkavých kyselin, TK, v miliekvivalentech na litr je:

CK – NK

9.2. Vyjádřeno v mg kyseliny octové na litr:

Nechť:

CK′ = celkový obsah kyselin v mg kyseliny octové na litr

NK′ = obsah netěkavých kyselin v mg kyseliny octové na litr

Obsah těkavých kyselin, TK, v mg kyseliny octové na litr je:

CK′ – NK′

9.3. Vyjádřeno v g kyseliny octové na hl čistého alkoholu o 100 % objemových je: $\frac{CK' - NK'}{A} \times 10$

kde A je objemový obsah alkoholu v lihovině

10. **Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)**

10.1. Statistické výsledky mezilaboratorního testu

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1] [2].

Rok provedení mezilaboratorního testu	**2000**
Počet laboratoří	18
Počet vzorků	6

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	16	18	18	14	18	18
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	2			4		
Počet zahrnutých výsledků	32	36	36	28	36	36
Střední hodnota ($\bar{x}$) [mg/L]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti, s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5

▼**M2**

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti, RSDr [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Mez opakovatelnosti, r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Mez reprodukovatelnosti, R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Typy vzorků

A Švestkový destilát: rozdělená úroveň (*).

B Rum I: neoznačené duplikáty.

C Rum II: rozdělená úroveň (*).

D Slivovice: neoznačené duplikáty.

E Brandy: neoznačené duplikáty.

F Matolinová pálenka: neoznačené duplikáty.

[1] Horwitz, W., *„Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies“, Pure and Applied Chemistry* 67, 1995, s. 332–343.

[2] Horwitz, W., *„Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs“, Analytical Chemistry* 54, 1982, s. 67 A–76 A.

▼M1

V. ANETHOL. STANOVENÍ *trans*-ANETHOLU V LIHOVINÁCH PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ

1. **Oblast použití**

Tato metoda je vhodná pro stanovení *trans*-anetholu v anýzových lihovinách kapilární plynovou chromatografií.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987, Voda pro použití v analytických laboratořích – Specifikace a zkušební metody.

3. **Podstata metody**

Koncentrace *trans*-anetholu v lihovině se stanoví plynovou chromatografií (GC). Ke zkušebnímu vzorku a k referenčnímu roztoku *trans*-anetholu o známé koncentraci se přidá stejné množství vnitřního standardu, např. 4-allylanisolu (estragolu), pokud vzorek neobsahuje přirozené množství estragolu; zkušební roztok i referenční roztok se zředí 45 % roztokem ethanolu a přímo se nastříknou do plynového chromatografu. U likérů, které obsahují velké množství cukrů, je nezbytné provést extrakci před přípravou vzorku a rozborem.

4. **Reakční činidla a materiál**

Při rozboru se použijí pouze reakční činidla o čistotě nejméně 98 %. Použije se voda o čistotě alespoň 3 podle normy ISO 3696.

Referenční materiály se skladují v chladu (při 4 °C), chráněny před světlem, v hliníkových nádobách nebo tmavých (hnědých) skleněných reagenčních láhvích. Zátky by měly být překryty nejlépe hliníkovou fólií. Před použitím musí být krystalický anethol převeden táním do kapalné fáze, teplota však při tom nesmí v žádném případě překročit 35 °C.

4.1 Ethanol o 96 % objemových (CAS 64-17-5).

4.2 1-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)benzen, (*trans*-anethol) (CAS 4180-23-8).

4.3 4-allylanisol, (estragol) (CAS 140-67-0), doporučený vnitřní standard (IS).

4.4 Ethanol o 45 % objemových

K 378 g ethanolu o 96 % objemových se přidá 560 g destilované vody.

4.5 Příprava standardních roztoků

Všechny standardní roztoky se skladují při laboratorní teplotě (15 až 35 °C), chráněny před světlem, v hliníkových nádobách nebo tmavých (hnědých) skleněných reagenčních láhvích. Zátka by měla být překryta nejlépe hliníkovou fólií.

trans-Anethol a 4-allylanisol jsou prakticky nerozpustné ve vodě a před přidáním ethanolu o 45 % objemových (4.4) musí být rozpuštěny v malém množství ethanolu o 96 % objemových(4.1).

Zásobní roztoky musí být každý týden čerstvě připraveny.

4.5.1 Standardní roztok A

Zásobní roztok *trans*-anetholu (koncentrace: 2 g/l)

Do odměrné baňky na 20 ml se odváží 40 mg *trans*-anetholu (4.2) (nebo 400 mg do odměrné baňky na 200 ml, atd.). Přidá se malé množství ethanolu o 96 % objemových (4.1), objem se doplní ethanolem o 45 % objemových (4.4) a důkladně se promíchá.

▼M1

4.5.2 Roztok vnitřního standardu B

Zásobní roztok vnitřního standardu, např. estragolu (koncentrace: 2 g/l)

Do odměrné baňky na 20 ml se odváží 40 mg estragolu (4.3) (400 mg do odměrné baňky na 200 ml, atd.). Přidá se malé množství ethanolu o 96 % objemových (4.1), objem se doplní ethanolem o 45 % objemových (4.4) a důkladně se promíchá.

4.5.3 Roztoky pro kontrolu linearity odezvy plamenově-ionizačního detektoru (FID)

Pro účely rozboru musí být kontrolována linearita odezvy FID, přičemž musí být zohledněn rozsah koncentrací *trans*-anetholu v lihovinách, který je 0 až 2,5 g/l. Při rozboru se neznámé vzorky lihovin, u nichž má být prováděn rozbor, ředí 10krát (8.3). Pro podmínky rozboru popsané v této metodě se následujícím způsobem připraví zásobní roztoky odpovídající těmto koncentracím *trans*-anetholu ve vzorku, u něhož má být prováděn rozbor: 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 a 0,25 g/l: do jednotlivých odměrných baněk na 20 ml se pipetou odměří 0,5, 1, 1,5, 2 a 2,5 ml zásobního roztoku A (4.5.1); do každé baňky se pipetou odměří 2 ml roztoku vnitřního standardu B (4.5.2), objem se doplní ethanolem o 45 % objemových (4.4) a důkladně se promíchá.

Jako roztok o koncentraci 0 g/l se použijí roztoky určené pro slepý pokus (8.4).

4.5.4 Standardní roztok C

Do odměrné baňky na 20 ml se pipetou odměří 2 ml standardního roztoku A (4.5.1), poté se přidají 2 ml roztoku vnitřního standardu B (4.5.2), objem se doplní ethanolem o 45 % objemových (4.4) a důkladně se promíchá.

5. **Přístroje a vybavení**

5.1 Kapilární plynový chromatograf vybavený plamenově-ionizačním detektorem (FID), integrátorem nebo jiným zařízením pro zpracování dat, které umožňuje měřit plochy píků nebo výšky píků, a automatickým dávkovačem nebo nezbytným zařízením pro ruční nástřik vzorku.

5.2 Nástřikový systém *split/splitless*

5.3 Kapilární kolona, například:

Délka: 50 m

Vnitřní průměr: 0,32 mm

Tloušťka filmu: 0,2 μm

Stacionární fáze: FFAP – zesítěný porézní modifikovaný TPA polyethylenglykol.

5.4 Obvyklé laboratorní vybavení: Kalibrované odměrné laboratorní sklo, analytické váhy (přesnost: ±0,1 mg).

6. **Chromatografické podmínky**

Typ kolony, její rozměry a chromatografické podmínky se zvolí tak, aby došlo k oddělení anetholu od vnitřního standardu a od jakýchkoli rušivých látek. Typické podmínky pro kolonu uvedenou jako příklad v bodě 5.3 jsou tyto:

▼M1

6.1 Nosný plyn: helium p. a.

6.2 Průtok: 2 ml/min

6.3 Teplota nástřiku: 250 °C

6.4 Teplota detektoru: 250 °C

6.5 Teplotní podmínky pece: isotermní, 180 °C, doba analýzy (běhu) 10 minut

6.6 Nastřikovaný objem: 1 µl, dělicí poměr 1: 40.

7. **Vzorky**

Vzorky se skladují při laboratorní teplotě, chráněny před světlem a chladem.

8. **Postup**

8.1 Orientační zkouška vzorku na přítomnost estragolu

Pro ujištění, že vzorek neobsahuje přirozené množství estragolu, se provede rozbor vzorku bez přídavku jakéhokoli vnitřního standardu. Obsahuje-li vzorek přirozené množství estragolu, musí být zvolen jiný vnitřní standard (například menthol).

Do odměrné baňky na 20 ml se pipetou odměří 2 ml vzorku, objem se doplní ethanolem o 45 % objemových (4.4) a důkladně se promíchá.

8.2 Příprava neznámých vzorků

Do odměrné baňky na 20 ml se pipetou odměří 2 ml vzorku, poté se přidají 2 ml roztoku vnitřního standardu B (4.5.2), objem se doplní ethanolem o 45 % objemových (4.4) a důkladně se promíchá.

8.3 Roztok určený pro slepý pokus

Do odměrné baňky na 20 ml se pipetou odměří 2 ml roztoku vnitřního standardu B (4.5.2), objem se doplní ethanolem o 45 % objemových (4.4) a důkladně se promíchá.

8.4 Test linearity

Před zahájením rozboru se zkontroluje linearita odezvy FID tak, že se třikrát po sobě proměří každý ze standardních roztoků pro kontrolu linearity odezvy (4.5.3).

Z hodnot ploch píků nebo výšek píků získaných z integrátoru pro každý nástřik se sestrojí graf závislosti poměru R na koncentraci jejich mateřského roztoku v g/l.

R; = výška nebo plocha píku *trans*-anetholu dělená výškou nebo plochou píku estragolu.

Měla by být získána lineární závislost.

8.5 Stanovení

V dále uvedeném pořadí se provede nástřik roztoku určeného pro slepý pokus (8.3), standardního roztoku C (4.5.4), jednoho ze standardních roztoků pro kontrolu linearity odezvy (4.5.3), který bude sloužit jako vzorek pro řízení jakosti (může být zvolen podle pravděpodobné koncentrace *trans*-anetholu v neznámém vzorku) a pěti neznámých vzorků (8.2); po každých pěti neznámých vzorcích se nastříkne standard pro kontrolu linearity odezvy (řízení jakosti), aby byla potvrzena stabilita rozboru.

▼M1

9. **Výpočet odezvového faktoru**

Změří se plochy píků (integrátorem nebo jiným systémem zpracování dat) nebo (ručně) výšky píků *trans*-anetholu a vnitřních standardů.

9.1 Výpočet odezvového faktoru (RF_i)

Odezvový faktor se vypočte takto:

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

pri čemer je:

C_i je koncentrace *trans*-anetholu ve standardním roztoku A (4.5.1)

C_{is} je koncentrace vnitřního standardu ve standardním roztoku B (4.5.2)

plocha_i je plocha (nebo výška) píku *trans*-anetholu

plocha_{is} je plocha (nebo výška) píku vnitřního standardu

RF_i se vypočte z pěti vzorků roztoku C (4.5.4).

9.2 Rozbor roztoků pro kontrolu linearity odezvy

Nastříknou se roztoky pro kontrolu linearity odezvy (4.5.3).

9.3 Rozbor vzorku

Nastříkne se roztok neznámého vzorku (8.2).

10. **Výpočet výsledků**

Vzorec pro výpočet koncentrace *trans*-anetholu zní takto:

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

kde:

c_i	je neznámá koncentrace *trans*-anetholu
C_{is}	je koncentrace vnitřního standardu v neznámém vzorku (4.5.2)
plocha_i nebo výška_i	je plocha nebo výška píku *trans*-anetholu
plocha_{is} nebo výška_{is}	je plocha nebo výška píku vnitřního standardu
RF_i	je odezvový faktor (vypočtený podle bodu 9.1)

Koncentrace *trans*-anetholu se vyjadřuje v gramech na litr na jedno desetinné místo.

11. **Zabezpečení a řízení jakosti**

Na chromatogramech musí být anethol oddělen od vnitřního standardu a od ostatních rušivých látek. Hodnota RF_i se vypočte z výsledků pro pět po sobě jdoucích nástřiků roztoku C (4.5.4). Leží-li variační koeficient (CV % = (směrodatná odchylka/průměr)*100)) v intervalu ± 1 %, je průměrná hodnota RF_i přijatelná.

▼M1

Výše uvedený výpočet se použije pro výpočet koncentrace *trans*-anetholu ve vzorku pro řízení jakosti vybraného z roztoků pro kontrolu linearity odezvy (4.5.3).

Nacházejí-li se vypočtené průměrné výsledky z rozboru roztoků pro kontrolu linearity odezvy zvolených jako vzorky pro vnitřní řízení jakosti (IQC) v intervalu ± 2,5 % kolem jejich teoretické hodnoty, lze výsledky neznámých vzorků přijmout.

12. **Zpracování vzorků lihovin obsahujících velké množství cukru a zpracování vzorků likérů před rozborem GC**

Extrakce alkoholu z lihovin obsahujících velké množství cukru s cílem umožnit stanovení koncentrace *trans*-anetholu kapilární plynovou chromatografií.

12.1 Podstata metody

K alikvotnímu množství vzorku likéru se přidá vnitřní standard v koncentraci, která je srovnatelná s koncentrací analytu (*trans*-anetholu) v likéru. Poté se přidá fosforečnan sodný dodekahydrát a bezvodý síran amonný. Výsledná směs se dobře protřepe a ochladí, přičemž se vytvoří dvě fáze; horní alkoholová fáze se oddělí. Z této alkoholové fáze se odebere alikvot, který se zředí ethanolem o 45 % objemových (4.4) (Poznámka: na tomto stupni se nepřidává žádný vnitřní standard, neboť již byl přidán). U výsledného roztoku se provádí rozbor plynovou chromatografií.

12.2 Reakční činidla a materiál

Při extrakci se používají pouze reakční činidla o čistotě vyšší než 99 %.

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

12.2.2 Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, (CAS 10039-32-4).

12.3 Přístroje a vybavení

Erlenmeyerovy baňky, dělicí nálevky, lednička.

12.4 Postup

12.4.1 Orientační zkouška vzorku na estragol

Pro ujištění, že vzorek neobsahuje přirozené množství estragolu, se provede extrakce roztoku pro slepý pokus (12.6.2) a rozbor se provede bez přídavku jakéhokoli vnitřního standardu. Obsahuje-li vzorek přirozené množství estragolu, musí být zvolen jiný vnitřní standard.

12.4.2 Extrakce

Do Erlenmeyerovy baňky se pipetou odměří 5 ml ethanolu o 96 % objemových (4.1), odváží se 50 mg vnitřního standardu (4.3) a přidá se 50 ml vzorku. Přidá se 12 g bezvodého síranu amonného (12.2.1) a 8,6 g hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu (12.2.2). Erlenmeyerova baňka se uzavře zátkou.

Baňka se alespoň 30 minut protřepává. Může být použita mechanická třepačka, nikoli však teflonové magnetické míchadlo, neboť teflon může adsorbovat malé množství analytu. Je třeba poznamenat, že se přidaná sůl nerozpustí beze zbytku.

Erlenmeyerova baňka uzavřená zátkou se umístí alespoň na dvě hodiny do ledničky (T < 5 °C).

▼**M1**

Za tuto dobu se vytvoří dvě oddělené kapalné fáze a pevný zbytek. Alkoholová fáze by měla být čirá; v opačném případě se baňka opět umístí do ledničky, dokud nebude dosaženo úplného oddělení.

Poté, co se alkoholová fáze vyčeří, se opatrně odebere alikvot (např. 10 ml), aniž se poruší vodná fáze, převede se do tmavé ampulky a bezpečně se uzavře.

12.4.3 Příprava extrahovaného vzorku určeného k rozboru

Extrakt se nechá (12.4.2) temperovat na laboratorní teplotu.

Do odměrné baňky na 20 ml se pipetou odměří 2 ml temperované alkoholové fáze extrahovaného vzorku, objem se doplní ethanolem o 45 % objemových (4.4) a důkladně se promíchá.

12.5 Stanovení

Použije se postup uvedený v bodě 8.5.

12.6 Výpočet výsledků

Výsledky se vypočtou pomocí následujícího vzorce:

$C_i = (m_{is}/V)*(plocha_i/plocha_{is})*RF_i$

kde:

m_{is} je hmotnost vnitřního standardu (4.3) použitého v bodě 12.4.2 (v miligramech)

V je objem neznámého vzorku (50 ml)

RF_i je odezvový faktor (9.1)

$plocha_i$ je plocha píku *trans*-anetholu

$plocha_{is}$ je plocha píku vnitřního standardu

Výsledky se vyjádří v gramech na litr na jedno desetinné místo.

12.7 Zabezpečení a řízení jakosti

Použije se postup uvedený výše v bodě 11.

13. **Pracovní charakteristiky metody (přesnost)**

Statistické výsledky mezilaboratorního testu:

v následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty pro anethol.

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem.

Rok provedení mezilaboratorního testu	1998
Počet laboratoří	16
Počet vzorků	10
Analyt	anethol

▼**M1**

Pastis:

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	15	15	15	13	16	16
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	1	1	1	3	—	—
Počet zahrnutých výsledků	30	30	30	26	16	16
Střední hodnota g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Mez opakovatelnosti (*r*) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Mez reprodukovatelnosti (*R*) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Druhy vzorků:

A pastis, neoznačené duplikáty

B pastis, neoznačené duplikáty

C pastis, neoznačené duplikáty

D pastis, neoznačené duplikáty

E pastis, jeden vzorek

F pastis, jeden vzorek.

Další anýzové lihoviny:

Vzorky	G	H	I	J
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	16	14	14	14
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	—	2	1	1
Počet zahrnutých výsledků	32	28	28	28
Střední hodnota g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Mez opakovatelnosti (*r*) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Mez reprodukovatelnosti (*R*) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Druhy vzorků:

G ouzo, rozdělená úroveň (*)

H anýzová lihovina, neoznačené duplikáty

I anýzový likér, duplikátní vzorky

J anýzový likér, duplikátní vzorky.

▼M1

VI. GLYCYRRHIZOVÁ KYSELINA. STANOVENÍ GLYCYRRHIZOVÉ KYSELINY VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ

1. **Oblast použití**

Tato metoda je vhodná pro stanovení glycyrrhizové kyseliny v anýzových lihovinách vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Podle nařízení (EHS) č. 1576/89 musí lihoviny aromatizované anýzem, které jsou nazývány „pastis“, obsahovat od 0,05 do 0,5 gramů glycyrrhizové kyseliny na litr.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987, Voda pro použití v analytických laboratořích – Specifikace a zkušební metody.

3. **Podstata metody**

Koncentrace glycyrrhizové kyseliny se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detekcí. Standardní roztok a zkušební vzorek se zfiltrují a samostatně se přímo nastříknou do systému HPLC.

4. **Reakční činidla a materiál**

Při rozboru se použijí pouze reakční činidla čistoty pro HPLC, čistý ethanol a voda o čistotě alespoň 3 podle normy ISO 3696.

4.1 Ethanol o 96 % objemových (CAS 64-17-5).

4.2 Glycyrrhizát amonný, $C_{42}H_{62}O_{16} \cdot NH_4$ (amonná sůl glycyrrhizové kyseliny)

(Mol. hmotnost: 839,98) (CAS 53956-04-0): čistota alespoň 90 %

(Mol. hmotnost: glycyrrhizová kyselina 822,94).

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

4.4 Methanol, CH3OH (CAS 67-56-1).

4.5 Ethanol o 50 % objemových

Příprava 1 000 ml při 20 °C:

— ethanol o 96 % objemových (4.1): 521 ml

— voda (2.0): 511 ml.

4.6 Příprava elučních roztoků pro HPLC

4.6.1 Eluční roztok A (příklad)

80 (objemových) dílů vody (2.0)

20 (objemových) dílů octové kyseliny (4.3).

Eluční roztok se nechá pět minut odplynit.

Poznámka: Pokud nebyla použitá voda filtrována přes mikrofiltr, doporučuje se zfiltrovat připravený eluční roztok přes filtr pro organická rozpouštědla s velikostí pórů 0,45 μm nebo menší.

4.6.2 Eluční roztok B

Methanol (4.4).

4.7 Příprava standardních roztoků

Všechny standardní roztoky musí být každé dva měsíce čerstvě připraveny.

4.7.1 Referenční roztok C

Do odměrné baňky na 100 ml se s přesností na 0,1 mg odváží 25 mg glycyrrhizátu amonného (4.2). Přidá se malé množství ethanolu o 50 % objemových (4.5) a glycyrrhizát amonný se rozpustí. Po jeho rozpuštění se objem doplní po rysku ethanolem o 50 % objemových (4.5).

▼M1

Roztok se zfiltruje přes filtr pro organická rozpouštědla.

4.7.2 Standardní roztoky pro kontrolu linearity odezvy přístroje

Pro přípravu zásobního roztoku o koncentraci 1,0 g/l se do odměrné baňky na 100 ml odváží s přesností na 0,1 mg 100 mg glycyrrhizátu amonného. Přidá se malé množství ethanolu o 50 % objemových (4.5) a glycyrrhizát amonný se rozpustí. Po jeho rozpuštění se objem doplní po rysku ethanolem o 50 % objemových (4.5).

Připraví se nejméně čtyři další roztoky s koncentrací glycyrrhizátu amonného 0,05, 0,1, 0,25 a 0,5 g/l: do samostatných odměrných baněk na 100 ml se pipetou odměří 5 ml, 10 ml, 25 ml a 50 ml zásobního roztoku o koncentraci 1,0 g/l. Poté se objem roztoků doplní po rysku ethanolem o 50 % objemových (4.5) a roztoky se důkladně promíchají.

Všechny roztoky se zfiltrují přes filtr pro organická rozpouštědla.

5. **Přístroje a vybavení**

5.1 Separační systém

5.1.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf.

5.1.2 Čerpadlo umožňující s velkou přesností dosáhnout a udržet konstantní nebo programovatelný průtok.

5.1.3 Spektrofotometrický detekční systém s UV detekcí: nastavený na 254 nm.

5.1.4 Systém pro odplynění rozpouštědla.

5.2 Integrátor nebo zapisovač s výpočetním zařízením, provozně kompatibilní se zbytkem systému.

5.3 Kolona (příklad):

Materiál: korozivzdorná ocel nebo sklo

Vnitřní průměr: 4 až 5 mm

Délka: 100 až 250 mm

Stacionární fáze: zesítěný polymerně vázaný oktadecyl (C18) na silikagelu (přednostně sférickém), maximální velikost částic: 5 μm.

5.4 Laboratorní vybavení

5.4.1 Analytické váhy s přesností na 0,1 mg

5.4.2 Odměrné sklo třídy A

5.4.3 Zařízení pro membránovou mikrofiltraci malých objemů.

6. **Chromatografické podmínky**

6.1 Eluční charakteristiky: (příklad)

— průtok: 1 ml/min,

— eluční roztok A = 30 %,

— eluční roztok B = 70 %.

6.2 Detekce:

— UV = 254 nm.

7. **Postup**

7.1 Příprava vzorku lihoviny

Podle potřeby se zfiltruje přes filtr pro organická rozpouštědla (průměr pórů: 0,45 μm).

▼M1

7.2 Stanovení

Po ustavení chromatografických podmínek se provede

— nástřik 20 µl referenčního roztoku C (4.7.1),

— nástřik 20 µl roztoku vzorku,

— a oba chromatogramy se porovnají. Píky glycyrrhizové kyseliny se identifikují podle jejich retenčních časů. Změří se jejich plochy (nebo výšky) a z následující rovnice se vypočte koncentrace v g/l na dvě desetinná místa:

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

kde:

c je koncentrace glycyrrhizové kyseliny v gramech na litr analyzované lihoviny

C je koncentrace glycyrrhizátu amonného v referenčním roztoku v gramech na litr

h je plocha (nebo výška) píku glycyrrhizové kyseliny v analyzované lihovině

H je plocha (nebo výška) píku glycyrrhizové kyseliny v referenčním roztoku

P je čistota referenčního glycyrrhizátu amonného (v %)

823 je molární hmotnost glycyrrhizové kyseliny

840 je molární hmotnost glycyrrhizátu amonného

8. **Pracovní charakteristiky metody (přesnost)**

Statistické výsledky mezilaboratorního testu:

v následující tabulce jsou uvedeny hodnoty pro glycyrrhizovou kyselinu.

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem.

Rok provedení mezilaboratorního testu	1998
Počet laboratoří	16
Počet vzorků	5
Analyt	glycyrrhizová kyselina

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	13	14	15	16	16
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	3	2	1	—	—
Počet zahrnutých výsledků	26	28	30	32	32
Střední hodnota g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Mez opakovatelnosti (*r*) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013

▼**M1**

Vzorky	A	B	C	D	E
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Mez reprodukovatelnosti (*R*) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Druhy vzorků:

A pastis, neoznačené duplikáty

B pastis, rozdělená úroveň (*)

C pastis, neoznačené duplikáty

D pastis, neoznačené duplikáty

E pastis, neoznačené duplikáty.

▼M1

VII. CHALKONY. METODA PRO POTVRZENÍ PŘÍTOMNOSTI CHALKONŮ V PASTISU VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ

1. **Oblast použití**

Touto metodou lze zjistit, zda jsou v anýzových lihovinách přítomny chalkony. Chalkony jsou přírodní barviva ze skupiny flavonoidů přítomná v kořenu lékořice lysé (*Glycyrrhiza glabra*).

Anýzové lihoviny mohou být nazývány „pastis“, pokud obsahují chalkony (podle nařízení (EHS) č. 1576/89).

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987, Voda pro použití v analytických laboratořích – Specifikace a zkušební metody.

3. **Podstata metody**

Připraví se referenční výtažek lékořice. Přítomnost nebo nepřítomnost chalkonů se zjistí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detekcí.

4. **Reakční činidla a materiál**

Při rozboru se použijí pouze činidla čistoty pro HPLC. Použije se ethanol o 96 % objemových. Použije se pouze voda o čistotě alespoň 3 podle normy ISO 3696.

4.1 Ethanol o 96 % objemových (CAS 64-17-5).

4.2 Acetonitril, CH3CN, (CAS 75-05-8).

4.3 Referenční látka: Lékořice lysá (*Glycyrrhiza glabra*): lékořice, „sladký kořen“

Hrubě nadrcené kořeny lékořice lysé (*Glycyrrhiza glabra*). Průměrné rozměry podlouhlých částic: délka: 10 až 15 mm, tloušťka: 1 až 3 mm.

4.4 Octan sodný, CH3COONa, (CAS 127-09-3).

4.5 Ledová octová kyselina, CH3COOH, (CAS 64-19-7).

4.6 Příprava roztoků

4.6.1 Ethanol o 50 % objemových.

Příprava 1000 ml při 20 °C:

— ethanol o 96 % objemových (4.1): 521 ml,

— Voda (2.0): 511 ml.

4.6.2 Eluční roztok A: acetonitril

Acetonitril (4.2) čistoty pro HPLC.

Odplynit

4.6.3 Eluční roztok B: Pufr 0,1M roztok octanu sodného, pH 4,66.

Do odměrné baňky se odváží 8,203 g octanu sodného (4.4), přidá se 6,005 g ledové octové kyseliny (4.5) a objem se doplní vodou (2) do 1000 ml.

5. **Příprava referenčního extraktu z lékořice lysé (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3)**

5.1 Odváží se 10 g drceného kořene lékořice lysé (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) a vpraví se do destilační baňky s kulatým dnem,

— přidá se 100 ml ethanolu o 50 % objemových (4.6.1),

— vaří se pod zpětným chladičem jednu hodinu,

— zfiltruje se,

— a filtrát se uchová pro pozdější použití.

▼M1

5.2 Zbytek po filtraci extraktu z lékořice se oddělí z filtru

— vpraví se do destilační baňky s kulatým dnem,

— přidá se 100 ml ethanolu o 50 % objemových (4.6.1),

— vaří se pod zpětným chladičem jednu hodinu,

— zfiltruje se. Filtrát se uchová pro pozdější použití.

5.3 Extrakce kořene lékořice se provede třikrát po sobě.

5.4 Tři filtráty se spojí.

5.5 Rozpouštědlová fáze (z filtrátu v bodě 5.4) se odpaří na rotační odparce.

5.6 Zbylý extrakt (z úkonu v bodě 5.5) se rozpustí v 100 ml ethanolu o 50 % objemových (4.6.1).

6. **Přístroje a vybavení**

6.1 Separační systém.

6.1.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf.

6.1.2 Čerpadlo umožňující dosáhnout a udržet konstantní nebo programovatelný průtok při vysokém tlaku.

6.1.3 Spektrofotometrický detekční systém s UV/Vis detekcí nastavitelný na 254 a 370 nm.

6.1.4 Systém pro odplynění rozpouštědla.

6.1.5 Kolonový termostat nastavitelný na teplotu 40 ± 0,1 °C.

6.2 Integrátor nebo zapisovač s výpočetním zařízením, provozně kompatibilní se zbytkem separačního systému.

6.3 Kolona

Materiál: korozivzdorná ocel nebo sklo

Vnitřní průměr: 4 až 5 mm

Stacionární fáze: zesítěný polymerně vázaný oktadecyl (C18) na silikagelu, velikost částic: nejvýše 5 μm (zesítěná fáze).

6.4 Obvyklé laboratorní vybavení včetně:

6.4.1 analytických vah (přesnost: ± 0,1 mg);

6.4.2 destilační aparatury se zpětným chladičem skládající se například:

— z destilační baňky s kulatým dnem na 250 ml s normalizovaným zábrusem,

— zpětného chladiče o délce 30 cm a

— zdroje tepla (pyrogenní reakci destilovaného materiálu musí být zabráněno vhodným prvkem).

6.4.3 Rotační odparka.

6.4.4 Filtrační zařízení (např. Büchnerova nálevka).

6.5 Chromatografické podmínky (příklad).

6.5.1 Eluční charakteristiky rozpouštědel A (4.6.2) a B (4.6.3):

— gradientová změna z 20/80 (V/V) na 50/50 (V/V) během 15 minut,

— gradientová změna z 50/50 (V/V) na 75/25 (V/V) během pěti minut,

— isokratická eluce při 75/25 (V/V) pět minut,

▼M1

— stabilizace kolony mezi nástřiky,

— isokratická eluce při 20/80 (V/V) po dobu pěti minut,

6.5.2 Průtok: 1 ml/min.

6.5.3 Nastavení UV detektoru:

detektor musí být nastaven na 370 nm pro detekci chalkonů a poté na 254 nm pro detekci glycyrrhizové kyseliny.

Poznámka: změna vlnové délky (z 370 nm na 254 nm) musí být provedena 30 sekund před začátkem eluce píku odpovídajícího glycyrrhizové kyselině.

7. **Postup**

7.1 Příprava vzorku lihoviny

Zfiltruje se přes filtr pro organická rozpouštědla (průměr pórů: 0,45 μm).

7.2 Příprava zbytkového extraktu z lékořice (5.6)

Extrakt se před rozborem zředí ethanolem o 50 % objemových (4.6.1) v poměru jedna ku deseti.

7.3 Stanovení

7.3.1 Nastříkne se 20 μl připraveného extraktu z lékořice (7.2). Provede se rozbor za za výše uvedených chromatografických podmínek (6.5).

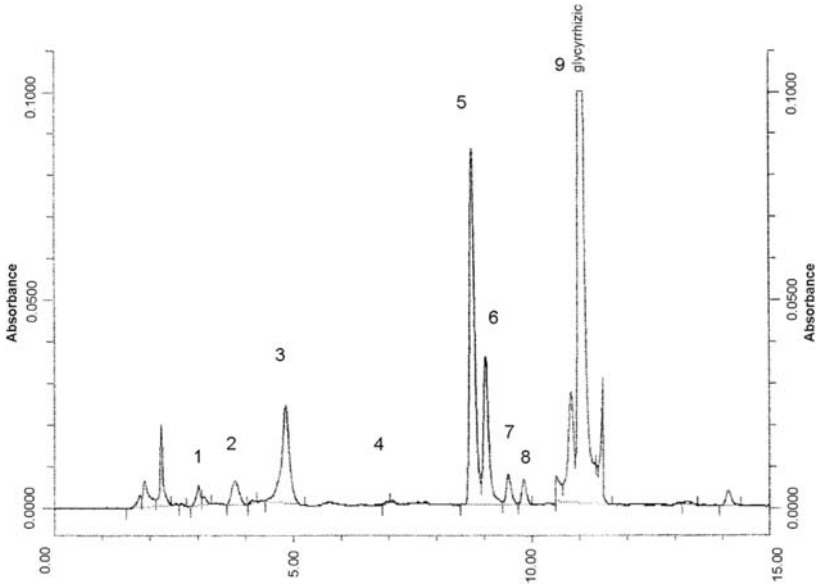
7.3.2 Nastříkne se 20 μl vzorku (7.1) (vzorek anýzové lihoviny). Provede se rozbor za výše uvedených chromatografických podmínek (6.5).

7.3.3 Oba chromatogramy se porovnají. Oba chromatogramy si musí být velmi podobné v oblasti eluce chalkonů (detekce při 370 nm za výše popsaných podmínek rozboru) (viz obrázek 1).

8. **Charakteristický chromatogram pastisu**

Obrázek 1

Chromatogram získaný výše popsanou metodou, dokazující přítomnost chalkonů v „pastisu“. Píky 1 až 8 přísluší chalkonům a pík 9 přísluší glycyrrhizové kyselině.



▼M1

9. **Pracovní charakteristiky metody (přesnost)**

Výsledky mezilaboratorního testu:

v následující tabulce jsou uvedeny výsledky zjišťování přítomnosti chalkonů v pastisu a v anýzových lihovinách.

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem.

Rok provedení mezilaboratorního testu	1998
Počet laboratoří	14
Počet vzorků	11
Analyt	chalkony

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	14	14	14	14	14	13
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	—	—	—	—	—	1 (*)
Počet zahrnutých výsledků	28	14	14	28	28	26
Počet výsledků: chalkony nalezeny	28	14	14	0	28	0
Počet výsledků: chalkony nenalezeny	0	0	0	28	0	26
Počet správných výsledků (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Nekonzistentní výsledky mezi dvěma duplikátními vzorky způsobené chybou při odběru.

Vzorky	G	H	I	J	K
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	14	14	14	14	14
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	—	—	—	—	—
Počet zahrnutých výsledků	28	14	14	28	28
Počet výsledků: chalkony nalezeny	0	0	0	0	0
Počet výsledků: chalkony nenalezeny	28	14	14	28	28
Počet správných výsledků (%)	100	100	100	100	100

Druhy vzorků:

A pastis, neoznačené duplikáty

B pastis, jeden vzorek

C pastis, jeden vzorek

D „pastis“ (neobsahující chalkony), neoznačené duplikáty

E „pastis“ (neobsahující chalkony), neoznačené duplikáty

F anýzový likér (neobsahující chalkony), neoznačené duplikáty

▼**M1**

G anýzový likér (neobsahující chalkony), neoznačené duplikáty

H ouzo (neobsahující chalkony), jeden vzorek

I ouzo (neobsahující chalkony), jeden vzorek

J anýzová lihovina (neobsahující chalkony), neoznačené duplikáty

K „pastis“ (neobsahující chalkony), neoznačené duplikáty.

▼M2

VIII. CELKOVÝ OBSAH CUKRU

1. **Oblast použití**

Ke stanovení celkového obsahu cukru (vyjádřeného jako invertní cukr) v lihovinách, s výjimkou lihovin obsahujících vaječné či mléčné produkty, je použitelná metoda HPLC–RI.

Tato metoda byla validována mezilaboratorní studií pro pastis, destilovaný anis, třešňový likér, crème de (s uvedením názvu ovoce nebo použité suroviny) a crème de cassis v množstvích od 10,86 g/l do 509,7 g/l. Linearita odezvy přístroje však byla prokázána pro rozsah koncentrace od 2,5 g/l do 20,0 g/l.

Tato metoda není určena pro stanovení nízkých hodnot obsahu cukru.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696:1987 Jakost vody pro analytické účely – Specifikace a zkušební metody

3. **Podstata metody**

K určení koncentrace glukózy, fruktózy, sacharózy, maltózy a laktózy v cukerných roztocích se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Tato metoda využívá alkylaminovou stacionární fázi a diferenční refraktometrickou detekci a slouží jako příklad. Jako stacionární fázi je možné použít také aniontoměničové pryskyřice.

4. **Reakční činidla a materiál**

4.1. Glukóza (CAS 50-99-7), o čistotě alespoň 99 %.

4.2. Fruktóza (CAS 57-48-7), o čistotě alespoň 99 %.

4.3. Sacharóza (CAS 57-50-1), o čistotě alespoň 99 %.

4.4. Laktóza (CAS 5965-66-2), o čistotě alespoň 99 %.

4.5. Monohydrát maltózy (CAS 6363-53-7), o čistotě alespoň 99 %.

4.6. Čistý acetonitril (CAS 75-05-8) na rozbor pomocí HPLC.

4.7. Destilovaná nebo demineralizovaná voda, nejlépe mikrofiltrovaná.

4.8. Rozpouštědla (příklad)

Eluční rozpouštědlo se skládá z:

75 objemových částí acetonitrilu (4.6)

25 objemových částí destilované vody (4.7)

Před použitím se nechá roztokem po dobu 5–10 minut pomalu procházet helium, aby došlo k odplynění.

Pokud se nepoužívá mikrofiltrovaná voda, je třeba rozpouštědlo přefiltrovat pomocí filtru pro organická rozpouštědla s maximální velikostí pórů 0,45 μm.

4.9. Absolutní ethanol (CAS 64-17-5).

4.10. Roztok ethanolu (5 % obj.).

4.11. Příprava standardního zásobního roztoku (20 g/l)

Odváží se 2 g každého cukru, který má být analyzován (4.1–4.5), a vzorky se beze ztrát přenesou do odměrné baňky o objemu 100 ml. (Poznámka: 2 g maltózy odpovídá 2,11 g monohydrátu maltózy).

▼M2

Doplní se roztokem alkoholu o 5 % obj. (4.10) do 100 ml, protřepe se a uchovává při teplotě přibližně + 4 °C. Každý týden se připraví nový zásobní roztok.

4.12. Příprava standardních pracovních roztoků (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 a 20,0 g/l)

Odpovídajícím způsobem se zředí zásobní roztok – 20 g/l (4.11) – roztokem alkoholu o 5 % obj. (4.10), aby se získalo pět standardních pracovních vzorků o hmotnostní koncentraci 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 a 20,0 g/l. Přefiltruje se pomocí filtru s maximální velikostí pórů 0,45 μm (5.3).

5. **Přístroje a vybavení**

5.1. Systém pro HPLC, který umožňuje separaci všech cukrů na základní linii.

5.1.1. Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s šesticestným vstřikovacím ventilem a 10 μl smyčkou nebo jiným automatickým nebo manuálním zařízením, které umožňuje spolehlivé dávkování velmi malých objemů.

5.1.2. Čerpací systém umožňující s velkou přesností dosáhnout stálého či programovaného průtoku a udržet jej.

5.1.3. Diferenciální refraktometr.

5.1.4. Integrátor či zapisovač, jehož výkon je kompatibilní s ostatním vybavením.

5.1.5. Předkolona:

Doporučuje se k analytické koloně připojit vhodnou předkolonu.

5.1.6. Kolona (příklad):

Materiál:	nerezavějící ocel nebo sklo.
Vnitřní průměr:	2–5 mm.
Délka:	100–250 mm (v závislosti na velikosti částic plnícího materiálu), například pokud je průměr částic 5 μm, odpovídající délka je 250 mm.
Stacionární fáze:	alkylaminové funkční skupiny vázané na oxid křemičitý s maximální velikostí častíc 5 μm.

5.1.7. Podmínky chromatografie (příklad):

Eluční rozpouštědlo (4.8.), průtok: 1 ml/minuta.

Detekce: Diferenční refraktometrie.

Aby byla zajištěna dokonalá stabilita detektoru, měl by být zapnutý po dobu několika hodin před použitím. Referenční část musí být naplněna elučním rozpouštědlem.

5.2. Analytické váhy s přesností 0,1 mg.

5.3. Filtr na malé objemy s mikromembránou 0,45 μm.

6. **Uchovávání vzorků**

Ihned po obdržení se vzorky umísťují do prostředí s pokojovou teplotou, kde jsou před rozborem uchovávány.

7. **Postup**

7.1. ČÁST A: Příprava vzorku

7.1.1. Vzorek se protřepe.

▼M2

7.1.2. Přefiltruje se pomocí filtru s maximální velikostí pórů 0,45 μm (5.3).

7.2. ČÁST B: HPLC

7.2.1. Stanovení

Vstříkne se 10 μl standardních roztoků (4.12.) a vzorků (7.1.2.). Za vhodných podmínek pro chromatografii, například výše popsaných, se provede rozbor.

7.2.2. Pokud je plocha (nebo výška) některého píku vzorku větší než u nejkoncentrovanějšího standardu, příslušný vzorek je třeba zředit destilovanou vodou a zanalyzovat znovu.

8. **Výpočet**

Srovnají se chromatogramy získané z rozboru standardního roztoku a z rozboru lihoviny. Podle retenčních časů se určí píky. Změří se plochy (či výšky) píků a metodou vnějšího standardu se vypočítají koncentrace. Zohlední se naředění vzorku.

Výsledkem je součet obsahu sacharózy, maltózy, laktózy, glukózy a fruktózy vyjádřený jako invertní cukr v g/l.

Invertní cukr se vypočítá jako součet všech přítomných monosacharidů a redukujících disacharidů plus stechiometrické množství glukózy a fruktózy vypočítané z přítomné sacharózy.

Invertní cukr (g/l) = glukóza (g/l) + fruktóza (g/l) + maltóza (g/l) + laktóza (g/l) + (sacharóza (g/l) × 1,05)

1,05 = (molekulární hmotnost fruktózy + molekulární hmotnost glukózy)/molekulární hmotnost sacharózy

9. **Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)**

9.1. Statistické výsledky mezilaboratorního testu

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1] [2].

Rok provedení mezilaboratorního testu	2000
Počet laboratoří	24
Počet vzorků	8

[1] Horwitz, W., *„Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies“, Pure and Applied Chemistry* 67, 1995, s. 332–343.

[2] Horwitz, W., *„Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs“, Analytical Chemistry* 54, 1982, s. 67 A–76 A.

Tabulka 1

Fruktóza, glukóza, maltóza

Analyt	Fruktóza		Glukóza			Maltóza	
Vzorky (× 2)	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Anýzové lihoviny	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Anýzové lihoviny	Standard (10 g/l)
Střední hodnota [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Počet laboratoří bez odlehlých výsledků	21	22	21	23	19	21	22

▼M2

Analyt	Fruktóza		Glukóza			Maltóza	
Vzorky (× 2)	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Anýzové lihoviny	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Anýzové lihoviny	Standard (10 g/l)
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r, [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Mez opakovatelnosti, r [g/l] (r = 2,8 × sr)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] (R = 2,8 × sR)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabulka 2

Sacharóza

Analyt	Sacharóza					
Vzorky	Pastis	Ouzo	Třešňový likér	Crème de menthe	Crème de cassis	Standard (100 g/l)
Střední hodnota [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Počet laboratoří bez odlehlých výsledků	19	19	20	18	18	18
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r, [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Mez opakovatelnosti, r [g/l] (r = 2,8 × s_r)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] (R = 2,8 × s_R)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) rozdělení na úrovně

▼M2

Tabulka 3

Celkový obsah cukru

(*Poznámka:* tyto údaje byly vypočítány pro celkový obsah cukru, ne pro invertní cukr definovaný výše v bodu 8.)

Vzorky	Pastis	Ouzo	Anýzové lihoviny	Třešňový likér	Crème de menthe	Crème de cassis	Standard (220 g/l)
Střední hodnota [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Počet laboratoří bez odlehlých výsledků	20	19	20	20	18	18	19
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r, [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Mez opakovatelnosti, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Mez reprodukovatelnosti R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) rozdělení na úrovně

▼M1

IX. VAJEČNÝ ŽLOUTEK. STANOVENÍ KONCENTRACE VAJEČNÉHO ŽLOUTKU V LIHOVINÁCH – FOTOMETRICKÁ METODA

1. Oblast použití

Tato metoda je vhodná pro stanovení koncentrace vaječného žloutku v rozsahu od 40 do 250 g/l ve vaječném likéru a v likéru s přídavkem vajec.

2. Odkazy na normy

ISO 3696: 1987, Voda pro použití v analytických laboratořích – Specifikace a zkušební metody.

3. Podstata metody

Extrahují se sloučeniny fosforu obsažené ve vaječném žloutku, které jsou rozpustné v ethanolu, a stanoví se fotometricky jako fosfato-molybdenanový komplex.

4. Reakční činidla a materiál

4.1 Redestilovaná voda.

4.2 Křemelina.

4.3 Ethanol o 96 % objemových (CAS 64-17-5).

4.4 15 % roztok octanu hořečnatého (CAS 16674-78-5).

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

4.6 1N kyselina sírová.

4.7 Roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (CAS 778-77-0), KH_2PO_4 o koncentraci 0,16 g/l.

4.8 Reakční činidla pro stanovení fosforečnanů:

20 g molybdenanu amonného (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ se rozpustí ve 400 ml vody při 50 °C;

v jiné nádobě se rozpustí 1 g vanadičnanu amonného (CAS 7803-55-6), NH4VO3, v 300 ml horké vody, roztok se nechá vyhladnout a poté se přidá 140 ml koncentrované kyseliny dusičné (CAS 7697-37-2). Vychladlé roztoky se spojí v odměrné baňce na 1 000 ml a objem se doplní po rysku 1 000 ml.

5. Přístroje a vybavení

5.1 Erlenmeyerova baňka na 100 ml

5.2 Ultrazvuková lázeň (nebo magnetická míchačka)

5.3 Odměrná baňka na 100 ml

5.4 Vodní lázeň temperovaná na 20 °C

5.5 Filtr (Whatman č. 4 nebo rovnocenný)

5.6 Porcelánový (nebo platinový) kelímek

5.7 Vroucí vodní lázeň

5.8 Topná deska

5.9 Muflová pec

5.10 Odměrná baňka na 50 ml

5.11 Odměrná baňka na 20 ml

5.12 Spektrofotometr nastavený na 420 nm

5.13 1cm kyveta.

▼M1

6. **Vzorky**

Vzorky se před rozborem uchovávají při laboratorní teplotě.

7. Postup

7.1 Příprava vzorku

7.1.1 Do Erlenmeyerovy baňky (5.1) na 100 ml se odváží 10 g vzorku.

7.1.2 Postupně po malých dávkách se přidá 70 ml ethanolu (4.3), přičemž se při každém přídavku intenzivně míchá, a roztok se umístí na 15 minut do ultrazvukové lázně (5.2) (nebo se při laboratorní teplotě míchá 10 minut na magnetické míchačce (5.2)).

7.1.3 Obsah Erlenmeyerovy baňky se převede za současného vyplachování ethanolem (4.3) do odměrné baňky na 100 ml (5.3). Objem se doplní ethanolem (4.3) po rysku a baňka se umístí do vodní lázně temperované na 20 °C (5.4). Objem se doplní po rysku při 20 °C.

7.1.4 Přidá se malé množství křemeliny (4.2) a roztok se zfiltruje (5.5); prvních 20 ml se odstraní.

7.1.5 25 ml filtrátu se převede do porcelánového (nebo platinového) kelímku (5.6). Filtrát se poté musí za přídavku 5 ml 15 % roztoku octanu hořečnatého (4.4) zkoncentrovat opatrným odpařováním na vroucí vodní lázni (5.7).

7.1.6 Kelímky se umístí na topnou desku (5.8) a zahřívají se, dokud se obsah neodpaří právě do sucha.

7.1.7 Zbytek se zpopelní a žíhá v muflové peci (5.9) při 600 °C do bílého popela nejméně jednu a půl hodiny, může se však také žíhat přes noc.

7.1.8 Popel se spolu s oplachovou destilovanou vodou převede pomocí 10 ml 10 % kyseliny sírové (4.5) do odměrné baňky na 50 ml (5.10) a objem se při laboratorní teplotě doplní po rysku destilovanou vodou (4.1). 5ml alikvot tohoto roztoku popela se použije k přípravě roztoku pro stanovení fosforečnanů fotometricky.

7.2 Stanovení fosforečnanů fotometricky

7.2.1 Srovnávací roztok

7.2.1.1 Do odměrné baňky na 50 ml (5.10) se odměří 10 ml 10 % kyseliny sírové (4.5) a objem se doplní po rysku destilovanou vodou (4.1).

7.2.1.2 K 5ml alikvotu tohoto roztoku (7.2.1.1) se v odměrné baňce na 20 ml (5.11) přidá 1 ml 1N kyseliny sírové (4.6) a 2 ml činidla pro stanovení fosforečnanů (4.8) a objem se doplní do 20 ml destilovanou vodou (4.1).

7.2.1.3 Baňka se volně uzavře zátkou, protřepe a zahřívá se 10 minut ve vroucí vodní lázni (5.7), poté se 20 minut chladí ve vodní lázni temperované na 20 °C (5.4).

7.2.1.4 Tímto srovnávacím roztokem se naplní 1cm kyveta (5.13).

7.2.2 Roztok vzorku

7.2.2.1 K 5ml alikvotu roztoku popela (7.1.8) se v odměrné baňce na 20 ml (5.11) přidá 1 ml 1N kyseliny sírové (4.6) a 2 ml činidla pro stanovení fosforečnanů (4.8) a objem se doplní do 20 ml destilovanou vodou (4.1).

▼M1

7.2.2.2 Baňka se volně uzavře zátkou, protřepe a zahřívá se 10 minut ve vroucí vodní lázni (5.7), poté se 20 minut chladí ve vodní lázni temperované na 20 °C (5.4).

7.2.2.3 Vznikne žlutý roztok, který se ihned proměří spektrofotometricky (5.12) v 1cm kyvetě (5.13) při 420 nm proti srovnávacímu roztoku (7.2.1.4).

7.2.3 Kalibrační křivka

7.2.3.1 Za účelem sestrojení kalibrační křivky se do odměrných baněk na 20 ml (5.11) obsahujících po 1 ml 1N kyseliny sírové (4.6) a jednotlivě 0, 2, 4, 6, 8, 10 ml dihydrogenfosforečnanu draselného (4.7) přidá po 2 ml činidla pro stanovení fosforečnanů (4.8) a objem se doplní po 20ml rysku destilovanou vodou (4.1).

7.2.3.2 Baňky se volně volně uzavřou zátkou, protřepou se a zahřívají se 10 minut ve vroucí vodní lázni (5.7), poté se 20 minut chladí ve vodní lázni temperované na 20 °C (5.4) a proměří se spektrofotometricky (5.12) v 1cm kyvetě (5.13) při 420 nm proti srovnávacímu roztoku (7.2.1.4).

7.2.3.3 Sestrojení kalibrační křivky:

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

8. **Vyjádření výsledků**

Obsah vaječného žloutku v g/l se vypočte pomocí tohoto vzorce:

$$\text{g/l vaje čn ý žloutek} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{hustota}}{E/40}$$

kde:

110	přepočítávací faktor pro celkový obsah P2O5 v gramech ve 100 g vaječného žloutku
mg P_2O_5	hodnota odečtená z kalibrační křivky
hustota	hmotnost vztažená na jednotku objemu likéru obsahujícího vaječný žloutek při 20 °C (g/ml)
E	hmotnost likéru obsahujícího vaječný žloutek v g
40	faktor ředění 5ml alikvotu roztoku popela.

9. **Pracovní charakteristiky metody (přesnost)**

Statistické výsledky mezilaboratorního testu:

v následující tabulce jsou uvedeny hodnoty pro vaječný žloutek.

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem.

Rok provedení mezilaboratorního testu	1998
Počet laboratoří	24
Počet vzorků	5
Analyt	vaječný žloutek

▼**M1**

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehlých výsledků	19	20	22	20	22
Počet odlehlých výsledků (laboratoří)	3	4	2	4	2
Počet zahrnutých výsledků	38	40	44	40	44
Střední hodnota g/l	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*S*r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti (*RSD*r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Mez opakovatelnosti (*r*) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*S*R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (*RSD*R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Mez reprodukovatelnosti (*R*) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Druhy vzorků

A Advocaat, neoznačené duplikáty

B Advocaat, neoznačené duplikáty

C Advocaat, neoznačené duplikáty

D Advocaat (zředěný), rozdělená úroveň (*)

E Advocaat, neoznačené duplikáty

▼M2

X. STANOVENÍ NÁSLEDUJÍCÍCH SLOUČENIN ZE DŘEVA V LIHOVINÁCH POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC): FURFURAL, 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL, 5-METHYLFURFURAL, VANILIN, SYRINGALDEHYD, KONIFERALDEHYD, SINAPALDEHYD, KYSELINA GALLOVÁ, KYSELINA ELLAGOVÁ, KYSELINA VANILOVÁ, KYSELINA SYRINGOVÁ A SKOPOLETIN

1. **Oblast použití**

Tato metoda umožňuje pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovit furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanilin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, kyselinu gallovou, kyselinu ellagovou, kyselinu vanilovou, kyselinu syringovou a skopoletin.

2. **Odkazy na normy**

Analytická metoda uznaná valným shromážděním Mezinárodní organizace pro révu a víno (OIV) a zveřejněná touto organizací pod číslem *OIV-MA-BS-16: R2009*.

3. **Podstata metody**

Stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a detekce ultrafialovou spektrofotometrií na několika vlnových délkách a spektrofluorimetrií.

4. **Reakční činidla**

Reakční činidla musí mít analytickou jakost. Je třeba použít destilovanou vodu nebo vodu přinejmenším srovnatelné čistoty. Doporučuje se použít mikrofiltrovanou vodu s měrným odporem 18,2 MΩ.cm.

4.1. Roztok alkoholu o 96 % obj.

4.2. Methanol jakosti vhodné pro metodu HPLC (rozpouštědlo B).

4.3. Kyselina octová o koncentraci 0,5 % obj. (Rozpouštědlo A).

4.4. Mobilní fáze: (pouze jako příklad).

Rozpouštědlo A (0,5 % kyselina octová) a rozpouštědlo B (čistý methanol). Přefiltrujte přes membránu (porozita 0,45 μm). Pokud nutno, odplyňte v ultrazvukové lázni.

4.5. Referenční standardy o minimálně o 99 % čistotě: furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanilin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, kyselina gallová, kyselina ellagová, kyselina vanilová, kyselina syringová a skopoletin.

4.6. Referenční roztok: standardní látky jsou rozpuštěny v 50 % obj. roztoku alkoholu a vody. Výsledné koncentrace v referenčním roztoku by měly být řádově:

furfural: 5 mg/l; 5-hydroxymethyl furfural: 10 mg/l; 5-methylfurfural 2 mg/l; vanilin: 5 mg/l; syringaldehyd: 10 mg/l; koniferaldehyd: 5 mg/l; sinapaldehyd: 5 mg/l; kyselina gallová: 10 mg/l; kyselina ellagová: 10 mg/l; kyselina vanilová: 5 mg/l; kyselina syringová: 5 mg/l; skopoletin: 0,5 mg/l.

5. **Přístroje a pomůcky**

Běžné laboratorní vybavení

5.1. Vysoce účinný kapalinový chromatograf podporující binární gradient, který obsahuje:

5.1.1. Spektrofotometrický detektor schopný měřit ve vlnových délkách 260–340 nm. Je však vhodnější použít detektor s diodovým polem schopný měřit ve více vlnových délkách nebo podobný detektor, aby bylo možné potvrdit čistotu píků.

▼M2

5.1.2. Spektrofluorimetrický detektor – excitační vlnová délka: 354 nm, emisní vlnová délka: 446 nm (pro stanovení skopoletinu – lze ho rovněž detekovat spektrofotometrií na vlnové délce 313 nm).

5.1.3. Dávkovací zařízení schopné vstříknout (například) 10 či 20 µl testovaného vzorku.

5.1.4. Kolona pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, typ RP C18, maximální velikost částic 5 µm.

5.2. Stříkačky na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).

5.3. Zařízení na membránovou filtraci malých objemů.

5.4. Integrátor či zapisovač, jehož výkon je kompatibilní s celou aparaturou; především musí mít několik přijímacích kanálů.

6. **Postup**

6.1. Příprava dávkovacího roztoku.

V případě potřeby jsou referenční roztok a lihovina přefiltrovány přes membránu s póry o průměru nejvýše 0,45 µm.

6.2. Podmínky pro provedení chromatografie: provede se rozbor při teplotě okolního prostředí pomocí vybavení popsaného v bodě 5.1 a za použití mobilních fází (4.4) s průtokem přibližně 0,6 ml za minutu podle níže uvedeného gradientu (pouze jako příklad).

Čas: 0 min. 50 min. 70 min. 90 min.

rozpouštědlo A (voda–kyselina): 100 % 60 % 100 % 100 %

rozpouštědlo B (methanol) 0 % 40 % 0 % 0 %

Je třeba mít na paměti, že v některých případech je třeba gradient upravit, aby nedošlo ke koeluci.

6.3. Stanovení

6.3.1. Referenční standardy se vstříknou odděleně, poté smíchané.

Provozní podmínky se upraví tak, aby separační faktor píků všech sloučenin byl přinejmenším 1.

6.3.2. Vzorek připravený v bodě 6.1 se vstříkne do aparatury.

6.3.3. Změří se plocha píků pro referenční roztoky a lihoviny a vypočítají se koncentrace.

7. **Vyjádření výsledků**

Koncentrace každé složky se vyjádří v mg/l.

8. **Pracovní charakteristiky metody (přesnost)**

Následující údaje byly získány v roce 2009 při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody, který zkoumal množství lihovin a byl prováděn mezinárodně dohodnutým postupem [1] [2].

8.1. Furfural:

Analyt	Furfural:					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	15	15	15	15	15	15
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	14	12	13	14	13	13

▼**M2**

Analyt	Furfural:					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Střední hodnota [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	8	15	5	13	3	5
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-hydroxymethylfurfural

Analyt	5-hydroxymethylfurfural					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	16	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	14	14	14	14	14	14
Střední hodnota [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-methylfurfural

Analyt	5-methylfurfural					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	11	11	11	11	11	11
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	11	11	8	11	10	11

▼**M2**

Analyt	5-methylfurfural					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Střední hodnota [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanilin

Analyt	Vanilin					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	15	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	16	15	16	16	16	16
Střední hodnota [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Syringaldehyd

Analyt	Syringaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	15	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	13	13	13	12	14	13

▼**M2**

Analyt	Syringaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Střední hodnota [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Koniferaldehyd

Analyt	Koniferaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	13	12	13	12	13	13
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	12	12	13	12	13	13
Střední hodnota [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinapaldehyd

Analyt	Sinapaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	14	14	14	14	15	14
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	14	13	12	13	13	12

▼**M2**

Analyt	Sinapaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Střední hodnota [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Kyselina gallová

Analyt	Kyselina gallová					
Vzorek	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	15	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	15	14	16	16	16	16
Střední hodnota [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times sr$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Kyselina ellagová

Analyt	Kyselina ellagová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	7	7	7	7	7	7
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	7	7	7	7	7	6

▼**M2**

Analyt	Kyselina ellagová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Střední hodnota [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Kyselina vanilová

Analyt	Kyselina vanilová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	15	15	15	15	15	15
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	12	11	14	14	15	14
Střední hodnota [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Kyselina syringová

Analyt	Kyselina syringová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	15	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	16	15	15	15	16	15

▼**M2**

Analyt	Kyselina syringová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Střední hodnota [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Skopoletin

Analyt	Skopoletin					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	10	10	10	10	10	10
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	9	8	9	8	8	8
Střední hodnota [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R[mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Mezní reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06

[1] Horwitz, W., *„Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies“, Pure and Applied Chemistry* 67, 1995, s. 332–343.

[2] Horwitz, W., *„Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs“, Analytical Chemistry* 54, 1982, s. 67 A–76 A.