

РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 2091/2002 НА КОМИСИЯТА

от 26 ноември 2002 година

за изменение на Регламент (ЕО) № 2870/2000 относно определяне на референтните методи на Общността за анализ на спиртни напитки

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Регламент (ЕИО) № 1576/89 на Съвета от 29 май 1989 г. за установяване на общи правила относно определянето, означаването и търговското представяне на спиртни напитки¹, изменен с Акта за присъединяване на Австрия, Финландия и Швеция, и по-специално член 4, параграф 8 от него,

като има предвид, че:

(1) Регламент (ЕО) № 2870/2000 на Комисията от 19 декември 2000 г. относно определяне на референтните методи на Общността за анализ на спиртни напитки² описва тези методи в приложение.

(2) Четири метода на анализ за определянето на трансанетол в анасонови спиртни напитки, глициризидова киселина и *chalcone* в пастис и яйчен жълтък в яйчен ликьор и ликьор с яйце са утвърдени съгласно международно признати процедури като част от изследователски проект, подпомаган от Комисията.

(3) Тези четири метода могат да бъдат признати за референтни методи на Общността и трябва да бъдат добавени в приложението към Регламент (ЕО) № 2870/2000.

(4) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Изпълнителния комитет по спиртни напитки,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Приложението към Регламент (ЕО) № 2870/2000 се изменя, както следва:

1. В резюмето на приложението, текстът „(p.m.)” в точки V, VI, VII и IX се заличава.
2. Глави V, VI, VII и IX в приложението към настоящия регламент се добавят след глава III.

Член 2

¹ ОВ L 160, 12.6.1989 г., стр. 1.

² ОВ L 333, 29.12.2000 г., стр. 20.

Настоящият регламент влиза в сила на седмия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейските общности*.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

Съставено в Брюксел на 26 ноември 2002 година.

За Комисията:
Franz FISCHLER
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

V. АНЕТОЛ. ГАЗОВО ХРОМАТОГРАФИЧНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТРАНС-АНЕТОЛ В СПИРТНИ НАПИТКИ

1. Обхват

Този метод е подходящ за определянето на транс-анетол в подправени с анасон спиртни напитки, като се използва капилярна газова хроматография.

2. Нормативни препратки

ISO 3696: 1987 г. Вода за аналитични лабораторни цели – Спецификации и методи на изследване.

3. Принципи

Концентрацията на транс-анетол в спирта се определя чрез газова хроматография (ГХ). Същото количество от вътрешен стандарт, т.е. 4-алиланизол (естрагол) в случай, че естраголят не присъства естествено в пробата, се прибавя към пробата за изследване и към транс-анетолен разтвор с известна концентрация, които след това се разреждат с 45 %-ен етанолов разтвор и се инжектират директно в системата ГХ. За ликьори с високо съдържание на захар е необходима екстракция преди приготвяне на пробата и анализ.

4. Реагенти и материали

По време на анализа трябва да се използват само реагенти с чистота най-малко 98 %. Използва се вода - клас най-малко 3, съгласно дефиницията на ISO 3696.

Съответните химикали се съхраняват на хладно (при 4 °C), далеч от светлина, в алуминиеви контейнери или в тъмни (кехлибарени) стъклени бутилки за реагенти. За предпочитане е запушалките да бъдат поставени с алуминиев печат. Транс-анетолят ще трябва да бъде „размразен” от своето кристално състояние преди употреба, но в този случай неговата температура никога не трябва да надвишава 35 °C.

4.1. Етанол 96 об. % (CAS 64-17-5)

4.2. 1-метокси-4-(1-пропенил) бензол; (транс-анетол) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-алиланизол, (естрагол) (CAS 140-67-0), предлаган вътрешен стандарт (BC)

4.4. Етанол 45 об. %

Прибавя се 560 g дестилирана вода към 378 g етанол 96 об. %.

4.5. Приготвяне на стандартни разтвори

Всички стандартни разтвори се съхраняват при стайна температура (15 до 35 °C) далеч от светлина в алуминиеви контейнери или в тъмни (кехлибарени) стъклени бутилки за реагенти. За предпочитане е запушалките да бъдат поставени с алуминиев печат.

Транс-анетолят и 4-алиланисолът са практически неразтворими във вода и следователно е необходимо да се разтворят транс-анетола и 4-алиланисол в 96 % етанол (4.1) преди да се добави 45 % етанол (4.4).

Запасите от разтвори трябва да бъдат пряно приготвени всяка седмица.

4.5.1. Стандартен разтвор А

Запасен разтвор от транс-анетол (концентрация: 2 g/l)

Претегля се 40 mg транс-анетол (4.2) в 20 ml обемна колба (400 mg в 200 ml и т.н.). Добавя се 96 об. % етанол допълва се до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

4.5.2. Вътрешния стандартен разтвор Б

Запасен разтвор от вътрешен стандарт, т.е. естрагол (концентрация: 2 g/l)

Претегля се 40 mg естрагол (4.3) в 20 милилитрова колба (400 mg в 200 ml и т.н.). Добавя се 96 об. % етанол допълва се до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

4.5.3. Разтвори, използвани за проверка на линейните показания на детектора за йонизация на пламъка (ДИП)

Линейните показания на ДИП трябва да бъдат проверени за анализа, вземайки предвид диапазон от концентрации на транс-анетол в спирта от 0 g/l до 2,5 g/l. В процеса на анализиране, неизвестните проби на спиртове, които ще се анализират се разреждат 10 пъти (8.3). За условията на анализа, описан в метода, запасните разтвори, съответстващи на концентрации 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 и 0,25 g/l на транс-анетол в пробата, която ще се анализира се приготвят както следва: взема се по 0,5, 1, 1,5, 2 и 2,5 ml запасен разтвор А (4.5.1) и се капва в отделни 20 милилитрови колби; капва се във всяка колба 2 ml от вътрешния стандартен разтвор Б (4.5.2) и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

Чистите разтвори (8.4) се използват като 0 g/l разтвор.

4.5.4. Стандартен разтвор В

Взема се 2 ml стандартен разтвор А (4.5.1) и се капва в 20 милилитрова колба, след това се прибавя 2 ml вътрешен стандартен разтвор Б (4.5.2) и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

5. Апаратура и оборудване

5.1. Капилярен газов хроматограф, поставен с детектор за йонизация на пламъка (ДИП) и интегратор или друга управляваща данните система, способна да измерва височини или повърхности на максимумите и с автоматичен пробатор или необходимото оборудване за ръчно инжектиране на проби.

5.2. Разделящ/неразделящ инжектор

5.3. Капилярна колона, например:

Дължина: 50 m

Вътрешен диаметър: 0,32 mm

Плътност на филма: 0,2 µm

Стационарна фаза: FFAP – модифициран ТРА полиетилен гликол порест полимер с напречни връзки.

5.4. Общо лабораторно оборудване: градуирана обемна стъклария, аналитична везна (точност: $\pm 0,1$ mg).

6. Хроматографски условия

Видът и размерите на колоните и условията на ГХ трябва да бъдат такива, че анетолът и вътрешният стандарт да са отделени един от друг и от всякакви външни вещества. Типичните условия за колоната, дадена за пример в 5.3 са:

6.1. Преносим газ: аналитичен хелий

6.2. Скорост на потока: 2 ml/min.

6.3. Температура на инжектора: 250 °C

6.4. Температура на детектора: 250 °C

6.5. Температурни условия на пещта: изотермична, 180 °C, период на експлоатация 10 min.

6.6. Инжекционен обем: 1 µl, разделяне 1:40.

7. Проби

Пробите се съхраняват при стайна температура, на тъмно и на хладно.

8. Процедура

8.1. Наблюдение на пробите за естрагол

За да е сигурно, че естраголят не присъства естествено в пробата, трябва да бъде извършен пълен анализ без да се добавя никакъв вътрешен стандарт. В случай, че естраголят присъства естествено в пробата, трябва да бъде избран друг вътрешен стандарт (например ментол).

Капва се 2 ml проба в 20 милилитрова колба и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

8.2. Приготвяне на неизвестни проби

Капва се 2 ml проба в 20 милилитрова колба, след това се прибавя 2 ml вътрешен стандартен разтвор Б (4.5.2) и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

8.3. Бланков разтвор

Капва се 2 ml вътрешен стандартен разтвор Б (4.5.2) в 20 милилитрова колба и се допълва до обем с 45 об. % етанол (4.4), разбърква се добре.

8.4. Линеен тест

Преди започване на анализа, линейността на показанията на ДИП се проверява чрез трикратно последователно анализиране на всеки от линейните стандартни разтвори (4.5.3).

Интегрираните повърхности или височини на максимумите за всяка инжекция образуват графика на концентрацията на техния базов разтвор в g/l спрямо отношението R за всяка една.

$R = \text{височина или повърхност на максимума на транс-анетол} / \text{височината или повърхността на максимума на естрагола}$.

Получава се линейна графика.

8.5. Определяне

Инжектира се бланковият разтвор (8.3), след това стандартен разтвор В (4.5.4), последван от един от линейните стандарти (4.5.3), който ще служи като проба за качествен контрол (тя може да бъде избрана като се има предвид вероятната концентрация на транс-анетол в неизвестната), след това пет неизвестни (8.2); вкарва се линейна (за контрол на качеството) проба след всеки пет неизвестни проби, за да се осигури аналитична стабилност.

9. Изчисляване на коефициента на отговор

Измерват се както повърхностите на максимум (като се използва интегратор или друга система за данни) или височините на максимума (ръчна интеграция) за транс-анетол и вътрешни стандартни максимуми.

9.1. Изчисляване на коефициента на отговор (RF)

Коефициентът на отговор се изчислява по следния начин:

$$Rf_i = (C_i / \text{повърхност или височина}_i) * (\text{повърхност или височина}_{is} / C_{is})$$

където:

C_i е концентрацията на транс-анетол в стандартния разтвор А (4.5.1)

C_{is} е концентрацията на вътрешен стандарт в стандартния разтвор Б (4.5.2)

област i е повърхността (или височината) на максимума на транс-анетол

област is е повърхността (или височината) на максимума на вътрешния стандарт

Rf_i се изчислява от петте проби на разтвора В (4.5.4).

9.2. Анализ на тестовите разтвори за линейни показания

Инжектира се тестов разтвор за линейни показания (4.5.3)

9.2. Анализ на пробата

Инжектира се неизвестен пробен разтвор (8.2).

10. Изчисляване на резултати

Формулата за изчисляване на концентрацията на транс-анетол е следната:

$$c_i = C_{is} * (\text{повърхност или височина}_i / \text{повърхност или височина}_{is}) * Rf_i$$

където:

c_i е неизвестната концентрация на транс-анетол

C_{is} е концентрацията на вътрешния стандарт в неизвестната (4.5.2)

повърхност или височина i е повърхността или височината на максимума на транс-анетола

повърхност или височина is е повърхността или височината на максимума на вътрешния стандарт

RF_i е коефициентът на отговор (изчислен както в 9.1)

Концентрацията на транс-анетол се изразява в грама на литър, до един десетичен знак.

11. Осигуряване на качество и контрол

Хроматограмите трябва да бъдат такива, че анетолът и вътрешният стандарт да са отделени един от друг и от всякакви външни вещества. Стойността на RF_i се изчислява от резултатите за петте инжекции на разтвор В (4.5.4). В случай, че коефициентът на изменение ($CV \% = (\text{стандартно отклонение/средно}) * 100$) е в рамките на плюс или минус 1 %, средната стойност на RF_i е приемлива.

Посоченото по-горе изчисление се използва за изчисляване на концентрацията на транс-анетол в пробата, избрана за контрол на качеството от линейните контролни разтвори (4.5.3).

В случай, че изчислените средни резултати от анализ на линейния разтвор, избран за проба за вътрешен контрол на качеството (ВКК) са в рамките на плюс или минус 2,5 % от тяхната теоретична стойност, тогава резултатите за неизвестните проби могат да се приемат.

12. Обработка на спиртна проба, съдържаща голямо количество захар и на ликьорна проба преди ГХ анализ

Извличане на алкохол от спиртна напитка, съдържаща голямо количество захар, за да може да се определи концентрацията на транс-анетол, като се използва капилярна газова хроматография.

12.1. Принцип

Взема се кратна на ликьоровата проба и към нея се прибавя вътрешния стандарт, при концентрация, близка до тази на анализа (транс-анетола) в ликьора. Към това се прибавя натриев фосфат додекахидрат и амониев сулфат без кристализационна вода. Получената смес се разбива добре и се охлажда до получаване на два пласта и горният алкохолен пласт се отстранява. Кратен на този алкохолен пласт се взема и се разрежда с 45 % етанолов разтвор (4.4) (Забележка: на този етап не се добавя вътрешен стандарт, тъй като вече е бил добавен). Полученият разтвор се анализира в газова хроматография.

12.2. Реагенти и материали

По време на екстракцията се използват само реагенти с чистота по-голяма от 99 %.

12.2.1. Амониев сулфат, едноводен, (CAS 7783-20-2).

12.2.2. Натриев фосфат, двуосновен, додекахидрат, (CAS 10039-32-4).

12.3. Апаратура и оборудване

Конусообразни колби, разделителни колби, хладилник.

12.3. Процедура

12.4.1. Наблюдение на пробата за естрагол

За да се осигури естраголят да не присъства естествено в пробата, пълна екстракция (12.6.2) и анализ трябва да бъдат извършени без прибавянето на никакъв вътрешен стандарт. В случай, че естраголят присъства естествено в пробата, трябва да избран друг вътрешен стандарт.

12.4.2. Екстракция

Капва се 5 ml от 96 % етанол (4.1) в конусообразна колба, добавя се 50 mg вътрешен стандарт (4.3) и се прибавя 50 ml от пробата. Прибавя се 12 g амониев сулфат, едноводен (12.2.1) и 8,6 g двуосновен натриев фосфат, додекахидрат (12.2.2). Конусообразната колба се запущва.

Колбата се разклаща в продължение най-малко на 30 минути. Може да се използва механично устройство за разклащане, но не и покрита с тефлон магнитна разбъркваща пръчка, тъй като тефлонът ще абсорбира част от анализа. Трябва да се отбележи, че прибавените соли няма да се разтворят напълно.

Запушената колба се поставя в хладилник ($T < 5^{\circ}\text{C}$) най-малко за два часа.

След този период трябва да има два различни течни слоя и твърда утайка. Алкохолният слой трябва да бъде чист; в случай, че не е, се поставя отново в хладилника докато се отдели чист.

В случай, че алкохолният пласт е чист, внимателно се взема кратен (т.е. 10 ml), без да се нарушава водния пласт, поставя се в кехлибарен съд и плътно се затваря.

12.4.3. Приготвяне на извлечената проба за анализ

Оставя се екстрактът (12.4.2) да достигне стайна температура.

Взема се 2 ml от алкохолния пласт на извлечената проба с умерена температура и се капва в 20 милилитрова колба, допълва се до обем с 45 % етанол (4.4), разбърква се добре.

12.5. Определяне

Следва се процедурата, описана в 8.5.

12.6. Изчисляване на резултати

За изчисляване на резултатите се използва следната формула:

$$C_i = (m_{is} / V) * (\text{повърхност}_i / \text{повърхност}_{is}) * Rf_i$$

Където:

m_{is} е масата на вътрешния стандарт (4.3), който е взет (12.4.2) (в милиграми)

V е обемът на неизвестна проба (50 ml)

Rf_i е коефициентът на отговор (9.1)

повърхност_i е повърхността на максимум на транс-анетол

повърхност_{is} е повърхността на максимум на вътрешен стандарт

Резултатите се изразяват в грама на литър, до един десетичен знак.

12.7. Качествен контрол и сигурност

Следва се процедурата, описана по-горе в 11.

13. Характеристики на работа на метода (точност)

Статистически резултати от вътрешнолабораторен тест:

Следващите таблици дават стойностите за анетол.

Следващите данни са получени от международно изучаване на работата на метода, направено съобразно международно съгласувани процедури.

Година на вътрешнолабораторния тест 1998 г.

Брой на лабораториите 16

Брой на пробите 10

Аналит: анетол

Пастис:

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	15	15	15	13	16	16
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	1	1	1	3	-	-
Брой на приетите резултати	30	30	30	26	16	16
Средна стойност g/l	1,47 7	1,95 5	1,94 0	1,83 3	1,74 1	1,754
Стандартно отклонение на повтаряемост (S_r) g/l	0,02 2	0,03 3	0,03 4	0,01 7	-	-

Относително стандартно отклонение на повтаряемост (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	-	-
Лимит на повтаряемост (r) g/l	0,06 2	0,09 3	0,09 6	0,04 7	-	-
Стандартно отклонение на възпроизвеждане (S_r) g/l	0,03 4	0,04 5	0,06 3	0,03 7	0,05 8	0,042
Относително стандартно отклонение на възпроизвеждане (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Лимит на възпроизвеждане (R) g/l	0,09 4	0,12 5	0,17 6	0,10 3	0,16 3	0,119

Видове проби:

А пастис, еднакви дубликати

Б пастис, еднакви дубликати

В пастис, еднакви дубликати

Г пастис, еднакви дубликати

Д пастис, единични дубликати

Е пастис, единични дубликати

Други спиртни напитки с анасон:

Проби	Ж	З	И	К
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	16	14	14	14
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	-	2	1	1
Брой на приетите резултати	32	28	28	28
Средна стойност g/l	0,778	1,742	0,351	0,599
Стандартно отклонение на повтаряемост (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Относително стандартно отклонение на повтаряемост (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Лимит на повтаряемост (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Стандартно отклонение на възпроизвеждане (S_r) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Относително стандартно отклонение на възпроизвеждане (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Лимит на възпроизвеждане (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Видове проби:

Ж узо, нива на разделяне (*)

З анасон, еднакви дубликати

И ликьор с анасон, дубликати

К ликьор с анасон, дубликати.

VI. ГЛИЦИРИЗИНОВА КИСЕЛИНА. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЛИЦИРИЗИНОВА КИСЕЛИНА ЧРЕЗ ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. Обхват

Този метод е подходящ за определянето на глицеризиновата киселина в спиртни напитки с анасон, като се използва високоефективна течна хроматография (ВЕТХ).

Съгласно Регламент (ЕИО) № 1576/89 всеки подправен с анасон спирт, който се нарича „пастис” трябва да съдържа от 0,05 до 0,5 g глицеризинова киселина на литър.

2. Нормативни препратки

ISO 3696: 1987 г. Вода за аналитични лабораторни цели – Спецификации и методи на изследване.

3. Принцип

Концентрацията на глицеризинова киселина се определя като се използва високоефективна течна хроматография (ВЕТХ) с UV детекция. Стандартен разтвор и пробата за тестване се филтрират и се инжектират поотделно директно в системата ВЕТХ.

4. Реагенти и материали

По време на анализа се използват само реагенти от степен ВЕТХ, чист етанол и вода от степен 3, както е дефинирано от ISO 3696.

4.1. Етанол 96 об. % (CAS 64-17-5).

4.2. Амониев глицеризинат, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (глицеризинова киселина амониева сол) (Mol. Wt.: 839,98)(CAS 53956-04-0): чистота най-малко 90 % (Mol. Wt.: глицеризинова киселина 822,94).

4.3. Оцетна киселина на кристали, CH_3COOH , (CAS 64-19-7).

4.4. Метанол, CH_3OH (CAS 67-56-1).

4.5. Етанол 50 об. %

За 1 000 ml при 20 °C:

- 96 об. % етанол (4.1): 521 ml

- вода (2.0): 511 ml

4.6. Приготвяне на ВЕТХ разтвори за отстраняване на вещества

4.6.1. Разтворител за отстраняване А (пример)

80 части (от обема) вода (2.0)

20 части (от обема) оцетна киселина (4.3).

Разтворителят за отстраняване се обезгазва за пет минути.

Забележка: В случай, че водата, която се използва не е била микрофилтрирана, е препоръчително да се филтрира приготвения разтворител за отстраняване чрез филтър за органични разтворители с размер на порите по-малък или равен на 0,145 μm .

4.6.2. Разтворител за отстраняване Б

Метанол (4.4).

4.7. Приготвяне на стандартни разтвори

Всички стандартни разтвори трябва да бъдат пряко приготвени след два месеца.

4.7.1. Референтен разтвор В

Претегля се с точност до 0,1 mg, 25 mg амониев глицеризинат (4.2) в 100 милилитрова колба. Прибавя се малко 50 об. % етанол и се разтваря амониевия глицеризинат. След като се е разтворил, се допълва до отбелязаното с 50 об. % етанол (4.5).

Филтрира се през филтър за органични разтворители.

4.7.2. Стандартни разтвори, които се използват за проверка на линейността на показанията на инструментите

Запасен разтвор 1,0 g/l се приготвя чрез претегляне с точност до 0,1 mg, 100 mg амониев глицеризинат в 100 милилитрова колба. Прибавя се малко 50 об. % етанол (4.5) и се разтваря амониевия глицеризинат. След като се е разтворил, се допълва до отбелязаното с 50 об. % етанол (4.5).

Най-малко четири други разтвора, съответстващи на 0,05, 0,1, 0,25 и 0,5 g/l амониев глицеризинат се приготвят като се капнат съответно 5 ml, 10 ml, 25 ml и 50 ml от запасния разтвор 1,0 g/l в отделни 100 милилитрови колби. След това се допълва до отбелязаното с 50 об. % етанол (4.5) и се разбърква добре.

Всички разтвори се филтрират през филтър за органични разтворители.

5. Апаратура и оборудване

5.1. Система за отделяне

5.1.1. Високоэффективен течен хроматограф.

5.1.2. Изпомпваща система, позволяваща да се достигне и поддържа постоянна или програмирана скорост на потока с голяма точност.

5.1.3. Система за UV спектрофотометрична детекция: да бъде поставена на 254 nm.

5.1.4. Система за обезгазяване на разтворителя.

5.2. Изчислителен интегратор или записващо устройство, работата на което е съвместима с останалата част на системата.

5.3. Колона (пример):

Материал: неръждаема стомана или стъкло

Вътрешен диаметър: от 4 до 5 mm

Дължина: от 100 до 250 mm

Стационарна фаза: силицев двуокис с напречни връзки с (за предпочитане сферична) октадецил функционална група (C18), максимален размер на частиците: 5 µm.

5.4. Лабораторно оборудване

5.4.1. Аналитична везна с точност 0,1 mg

5.4.2. Стъклария с обем А-клас

5.4.3. Микромембранна филтрация за малки обеми.

6. Хроматографски условия

6.1. Характеристики на разтвора за отстраняване на абсорбираните вещества: (пример)

- скорост на потока: 1 ml/min,
- разтворител А = 30 %,
- разтворител В = 70 %.

6.2. Детекция:

- UV = 254 nm

7. Процедура

7.1. Приготвяне на спиртната проба

Да се филтрира при необходимост чрез филтър за органични разтворители (диаметър на порите: 0,45 µm).

7.2. Определяне

След като се установят хроматографичните условия,

- се инжектира 20 µl референтен разтвор В (4.7.1.),
- се инжектира 20 µl от пробния разтвор,
- сравняват се двете хроматограми. Определят се максимумите на глицеризиновата киселина от тяхното време на задържане. Измерват се техните повърхности (или височини) и се изчислява концентрацията в g/l до втория десетичен знак, като се използва следното равенство:

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

Където:

c е концентрацията в грамове за литър на глицеризиновата киселина в спирта, който се анализира

C е концентрацията в грамове за литър на амониевия глицеризинат в референтния разтвор

h е повърхността (или височината) на максимума на глицеризиновата киселина на спирта, който се анализира

Н е повърхността (или височината) на максимума на глицеризиновата киселина на референтния разтвор

Р е чистотата на референтния амониев глицеризинат (в %)

823 е масата на един мол глицеризинова киселина

840 е масата на един мол амониев глицеризинат

8. Характеристики на работа на метода (точност)

Статистически резултати от вътрешнолабораторния тест:

Стойностите за глицеризиновата киселина са дадени в следната таблица:

Следните данни са получени от международно изследване действието на метода, извършено в съответствие с международно съгласувани процедури.

Година на вътрешнолабораторния тест 1998 г.

Брой на лабораториите 16

Брой на пробите 5

Аналит: глицеризинова киселина

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	13	14	15	16	16
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	3	2	1	-	-
Брой на приетите резултати	26	28	30	32	32
Средна стойност g/l	0,04 6	0,092 (*)0,0 99	0,089	0,24 9	0,49 3
Стандартно отклонение на повтаряемост (S_r) g/l	0,00 1	0,001	0,001	0,00 2	0,00 3
Относително стандартно отклонение на повтаряемост (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Лимит на повтаряемост (r) g/l	0,00 2	0,004	0,002	0,00 7	0,00 9
Стандартно отклонение на възпроизвеждане (S_R) g/l	0,00 4	0,007	0,004	0,00 6	0,01 3
Относително стандартно отклонение на възпроизвеждане (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Лимит на възпроизвеждане (R) g/l	0,01 1	0,019	0,010	0,01 8	0,03 7

Видове проби:

А пастис, еднакви дубликати

Б пастис, нива на разцепване (*)

В пастис, еднакви дубликати

Г пастис, еднакви дубликати

Д пастис, еднакви дубликати

VII. ХАЛКОНИ. ВИСОКОЕФЕКТИВЕН МЕТОД НА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ ЗА УСТАНОВЯВАНЕ НАЛИЧИЕТО НА ХАЛКОНИ В ПАСТИС

1. Обхват

Този метод е подходящ за определяне наличието или отсъствието на халкони в напитки, подправени с анасон. Халконите са естествени оцветители от рода на флавона, които се съдържат в корена на сладника (*Glycyrrhiza glabra*).

За да се нарече една подправена с анасон напитка „пастис“, тя трябва да съдържа *chalcone* (Регламент (ЕИО) № 1576/89).

2. Нормативни препратки

ISO 3696: 1987 г. Вода за аналитични лабораторни цели – Спецификации и методи на изследване.

3. Принцип

Приготвя се разтвор на референтен екстракт от сладник. Наличието или отсъствието на халкони се определя като се използва високоефективна течна хроматография (BETX) с UV детекция.

4. Реагенти и материали

По време на анализа се използват само реагенти от степен BETX. Етанолът трябва да бъде 96 об. %. Само вода със степен 3, както е определено от ISO 3696 трябва да се използва.

4.1. Етанол 96 об. % (CAS 64-17-5)

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

4.3. Референтно вещество: *Glycyrrhiza glabra*: сладник, „сладък корен“

Грубо смляни корени от сладник (*Glycyrrhiza glabra*). Средни размери на пръчковидните частици: дължина: от 10 до 15 mm, дебелина: от 1 до 3 mm.

4.4. Натриев ацетат, CH_3COONa , (CAS 127-09-3)

4.5. Оцетна киселина на кристали, CH_3COOH , (CAS 64-19-7)

4.6. Приготвяне на разтвори

4.6.1. Етанол 50 об. %

За 1 000 ml при 20°C:

- 96 об. %етанол (4.1.): 521 ml,

- вода (2.0): 511 ml

- 4.6.2. Разтворител А: ацетонирил

Ацетонирил (4.2.) с BETX аналитична чистота.

Обезгазява се.

4.6.3. Разтворител Б: 0,1 М буферен разтвор на натриев ацетат, pH 4,66.

Претегля се 8,203 g натриев ацетат (4.), добавя се 6,005 g кристализирала оцетна киселина (4.5) и се допълва до 1 000 ml с вода (2) в обемна колба.

5. Приготвяне на референтния екстракт от *Glycyrrhiza glabra* (4.3)

5.1.Претеглят се 10 g смлян корен от сладник (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) и се поставя в дестилационна колба с обло дъно

- добавят се 100 ml 50 об. % етанол (4.6.1),

- вари се на водна баня един час,

- филтрира се,

- филтратът се оставя настрана за по-късна употреба.

5.2.Извлича се екстрактът от сладник от филтъра

- поставя се в дестилационна колба с обло дъно,

- добавят се 100 ml от 50 об. % етанол (4.6.1),

- вари се на водна баня един час,

- филтрира се. Филтратът се оставя настрана за по-късна употреба.

5.3.Екстракцията на корен от сладник трябва да бъде извършена три пъти последователно.

5.4.Трите филтрата се смесват.

5.5.Изпарява се разтворителя (от 5.4.) върху ротативен изпарител.

5.6. Улавя се остатъчният екстракт (от 5.5) със 100 ml 50 об. % етанол (4.6.1).

6. Апаратура и оборудване

6.1. Сепарационна система.

6.1.1. Високоэффективен течен хроматограф.

6.1.2. Помпена система, която може да достигне и поддържа постоянна или зададена скорост на потока при високо налягане.

6.1.3. UV/видима спектрофотометрична детекционна система, която може да бъде поставена на 254 и 370 nm.

6.1.4. Система за обезгазяване на разтворителя:

6.1.5. Колонна пещ, която може да работи при температура $40 \pm 0,1$ °C.

6.2. Изчислителен интегратор или рекордер, който е съвместим с останалата част на сепарационната система.

6.3. Колонна

Материал: неръждаема стомана или стъкло

Вътрешен диаметър: от 4 до 5 mm

Постоянна съставка: кварц с напречни връзки с функционална група (C18) производна на октадецила, размер на частиците: 5 μ m най-много (съставка с напречни връзки).

6.4. Общо лабораторно оборудване, включително:

6.4.1. аналитична везна. (точност: $\pm 0,1$ mg);

6.4.2. дестилационна апаратура с хладник на водната баня, включващ например:

- 250 милилитрова колба с обло дъно със стандартизирана стъклена поставка,
- 30 cm дълъг хладник на водната баня и
- източник на топлина (всяка пирогенна реакция, при която извличащото вещество задължително да бъде избегнато чрез използването на подходяща подредба)

6.4.3. Ротативна апаратура за изпаряване.

6.4.4. Задаване на филтрация (т.е. фуния на *Buchner*).

6.5. Условия на хроматография (пример).

6.5.1. Характеристики на отстраняване на абсорбиращия материал чрез разтворител А (4.6.2) и Б (4.6.3):

- превключва се от 20/80 (v/v) до 50/50 (v/v) градиент за 15 минути,
- превключва се от 50/50 (v/v) до 75/25 (v/v) градиент за пет минути,
- еднаква мощност при 75/25 (v/v) за пет минути,
- стабилизация на колоната между инжекциите,
- еднаква мощност при 20/80 (v/v) за пет минути.

6.5.2. Скорост на потока: 1 ml/min

6.5.3. Настройка на UV детектора:

детекторът трябва да бъде поставен на 370 nm за да детектира наличието на халкони и след това на 254 nm за да детектира глицеризинова киселина.

Забележка: промяната на дължината на вълната (от 370 nm до 254 nm) трябва да бъде извършена 30 секунди преди началото на максимума на отстраняването на глицеризинова киселина.

7. Процедура

7.1. Приготвяне на спиртната проба

Филтрира се чрез филтър за органични разтвори (диаметър на порите: 0,45 μ m).

7.2. Приготвяне на остатъчния екстракт от сладник (5.6)

Прави се разтвор едно към десет с 50 об. % етанол (4.6.1) преди анализа.

7.3. Определяне

7.3.1. Инжектират се 20 μ l от приготвения екстракт от сладник (7.2). Анализът се извършва като се използват условията на хроматография, описани по-горе (6.5).

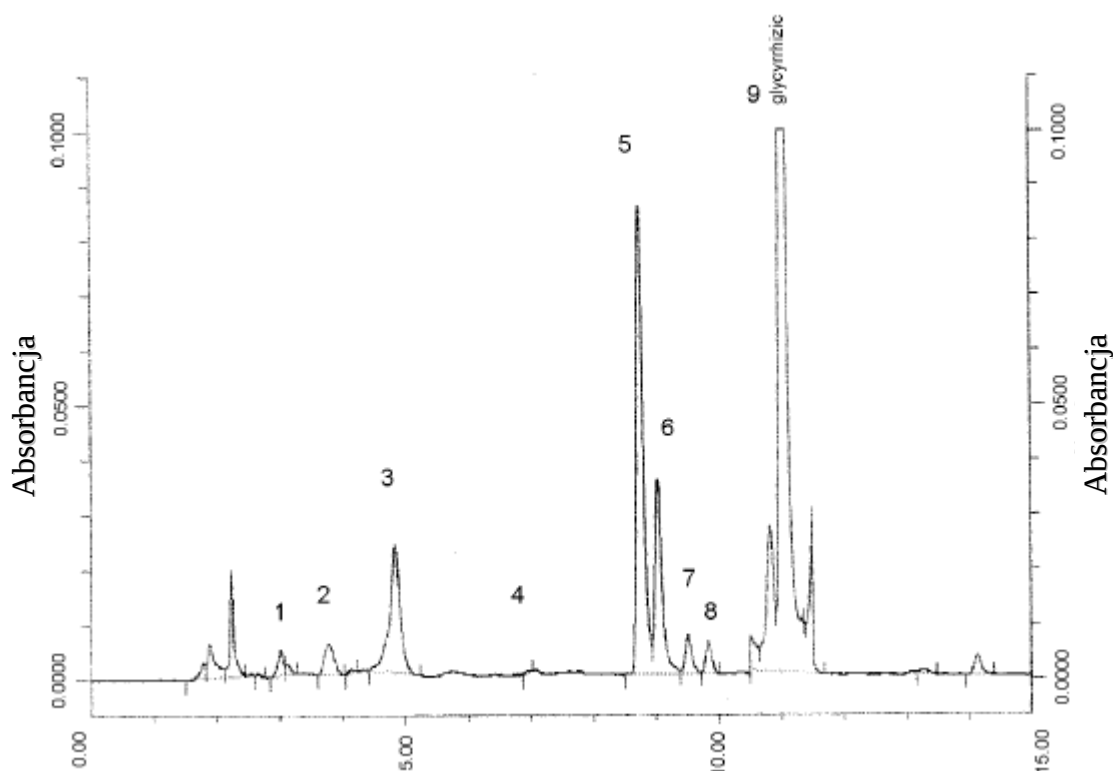
7.3.2. Инжектират се 20 µl от пробата (7.1) (спиртна проба, подправена с анасон). Анализът се извършва като се използват условията на хроматография, описани по-горе (6.5).

7.3.3. Сравняват се двете хроматограми. Двете хроматограми трябва да бъдат много сходни в халконовата изходна зона (по време на детекцията при 370 nm при условията на анализ, описани по-горе) (вж. Фиг. 1).

8. Хроматограма на характеристиките на пастис

Фигура 1

Хроматограма, получена чрез метода, описан по-горе, показваща присъствието на халкони в „пастис”. Максимумите от 1 до 8 са халкони, а максимум 9 е глицеризинова киселина.



9. Характеристики на работа на метода (точност)

Резултати от вътрешнолабораторния тест:

Следната таблица представя работата за установяване наличието или отсъствието на халкони в пастис и напитки, подправени с анасон.

Следващите данни са получени от международно изследване на работата на метода, направено съобразно международно съгласувани процедури.

Година на вътрешнолабораторния тест	1998 г.
Брой на лабораториите	14
Брой на пробите	11
Аналит:	халкони

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените	14	14	14	14	14	13

слоеве						
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	-	-	-	-	-	1 (*)
Брой на приетите резултати	28	14	14	28	28	26
Брой на резултатите, показващи наличие на халкони	28	14	14	0	28	0
Брой на резултатите, показващи отсъствие на халкони	0	0	0	28	0	26
Процент на точните резултати (%)	100	100	100	100	100	100
(*) Противоречиви резултати между двата дубликата, дължащи се на пробна грешка						

Проби	Ж	З	И	К	Л
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	14	14	14	14	14
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	-	-	-	-	-
Брой на приетите резултати	28	14	14	28	28
Брой на резултатите, показващи наличие на халкони	0	0	0	0	0
Брой на резултатите, показващи отсъствие на халкони	28	14	14	28	28
Процент на точните резултати (%)	100	100	100	100	100

Видове проби:

А пастис, еднакви дубликати

Б пастис, единична проба

В пастис, единична проба

Г „пастис” (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

Д „пастис” (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

Е ликьор, подправен с анасон (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

Ж ликьор, подправен с анасон (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

З узо (несъдържащо халкони), единична проба

И узо (несъдържащо халкони), единична проба

К анасон (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

Л „пастис” (несъдържащ халкони), еднакви дубликати

IX. ЯЙЧЕН ЖЪЛТЪК. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА ЯЙЧЕН ЖЪЛТЪК В СПИРТНИ НАПИТКИ – ФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД

1. Обхват

Този метод е подходящ за определянето на концентрацията на яйчен жълтък в границите на от 40 до 250 g/l в яйчен ликьор и ликьор с яйце.

2. Нормативни препратки

ISO 3696: 1987 г. Вода за аналитични лабораторни цели – Спецификации и методи на изследване.

3. Принцип

Разтворимите в етанол фосфорни съединения, открити в яйчен жълтък са извлечени и анализирани фотометрично като комплекс на фосфора и сол на молибденовата киселина.

4. Реагенти и материали

- 4.1. Двойно дестилирана вода
- 4.2. Диатомит
- 4.3. Етанол 96 об. % (CAS 64-17-5)
- 4.4. 15 % разтвор на магнезиев ацетат (CAS 16674-78-5)
- 4.5. 10 % сярна киселина (CAS 7664-93-9)
- 4.6. 1 N сярна киселина.
- 4.7. 0,16 g/l разтвор на калиев дихидроген фосфат (CAS 778-77-0), KH_2PO_4
- 4.8. Реагент за определяне на фосфата:
разтваря се 29 g амониева сол на молибденовата киселина (CAS 12054-85-2), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в 400 ml вода при 50° C;
разтваря се в друг съд 1 g амониев ванадит (CAS 7803-55-6), $(\text{NH}_4\text{VO}_3$ в 300 ml гореща вода, оставя се да изстине, след това се добавят 140 ml концентрирана азотна киселина (CAS 7697-37-2). Охладените разтвори се смесват в 1 000 милилитрова колба и се допълват до 1 000 ml.

5. Апаратура и оборудване

- 5.1. 100 ml конична колба
- 5.2. ултразвукова вана (или магнитна бъркалка)
- 5.3. 100 милилитрова колба
- 5.4. 20 °C водна баня
- 5.5. филтър (Whatman № 4 или еквивалентен)
- 5.6. порцеланов (или платинен) тигел
- 5.7. Вана с вряща вода
- 5.8. Гореща плоча
- 5.9. Муфелна пещ
- 5.10. 50 милилитрова колба
- 5.11. 20 милилитрова колба
- 5.12. Спектрометър, поставен на 420 nm
- 5.13. 1 сантиметрова епруветка.

6. Проби

Пробите се съхраняват преди анализ при стайна температура.

7. Процедура

- 7.1. Приготвяне на пробата
 - 7.1.1. Претегля се 10 g проба в 100 милилитрова конична колба (5.1).
 - 7.1.2. Добавя се постепенно 70 ml етанол (4.3) на малки порции, като се разбърква при всяко добавяне и се поставя в ултразвукова вана (5.2) за 15 минути (или сместа се разбърква с магнитна бъркалка (5.2) за 10 минути при стайна температура).
 - 7.1.3. Съдържанието на колбата се прехвърля в 100 милилитрова колба (5.3) с измиване на етанола (4.3). Наглася се до калибровъчния знак с етанол (4.3) и колбите се поставят в 20 °C водна баня (5.4). Наглася се до калибровъчния знак на 20 °C.
 - 7.1.4. Добавя се малко диатомит (4.2) и се филтрира (5.5), като първите 20 ml се изхвърлят.
 - 7.1.5. 25 ml от филтратата се прехвърлят в порцеланов (или платинен) тигел (5.6). Филтратът трябва след това да бъде концентриран чрез леко изпаряване във

вана с вряща вода (5.7), като се добави 5 ml 15 % разтвор на магнезиев ацетат (4.4).

- 7.1.6. Тигелите се поставят върху гореща плоча (5.8) и се нагреват до изсушаване.
- 7.1.7. Остатъкът се изгаря до пепел като се нагрева до нажежаване до бяло при 600 °C в муфелна пещ (5.9) докато пепелта стане бяла, най-малко един час и половина, но може да се остави и една нощ.
- 7.1.8. Пепелта се улавя с 10 ml 10 % сярна киселина (4.5) и се прехвърля с измиване с дестилирана вода (4.1) в 50 милилитрова колба (5.10) и се напълва до знака при стайна температура с дестилирана вода (4.1). 5 ml кратен на този разтвор от пепел ще се използва за приготвяне на пробния разтвор на фотометричния анализ на фосфата.

7.2. Фотометричен анализ на фосфата

7.2.1. Разтвор за сравнение

7.2.1.1. Поставят се 10 ml 10 % сярна киселина (4.5) в 50 милилитрова колба (5.10) и се допълва до означението с дестилирана вода (4.1).

7.2.1.2. Към 5 ml кратен на този разтвор (7.2.1.1), съдържащ се в 20 милилитрова колба (5.11), се добавя 1 ml 1 N сярна киселина (4.6) и 2 ml от фосфатния реагент (4.8) и се допълва до 20 ml с дестилирана вода (4.1).

7.2.1.3. Запушва се с хлабава запушалка, разклаща се и се нагрева във вана с вряща вода (5.7) за 10 минути, след това се охлажда в 20 °C водна баня (5.4) за 20 минути.

7.2.1.4. Епруветка 1 cm (5.13) се напълва с този разтвор за сравнение.

7.2.2. Пробен разтвор

7.2.2.1. Към 5 ml кратен на разтвора от пепел (7.1.8), съдържащ се в 20 милилитрова колба (5.11), се добавя 1 ml 1 N сярна киселина (4.6) и 2 ml от фосфатния реагент (4.8) и се допълва до 20 ml с дестилирана вода (4.1).

7.2.2.2. Запушва се с хлабава запушалка, разклаща се и се нагрева във вана с вряща вода (5.7) за 10 минути, след това се охлажда в 20 °C водна баня (5.4) за 20 минути.

7.2.2.3. Жълтият разтвор, който се получава, незабавно се анализира спектрофотометрично (5.12) в 1-сантиметрова епруветка (5.13) при 420 nm спрямо разтвора за сравнение (7.2.1.4).

7.2.3. Калибрационна крива

7.2.3.1. За да се построи калибрационната крива, се добавя 2 ml кратен на фосфатния реагент (4.8) към 20 милилитрови колби (5.11), всяка от които съдържа 1 ml от 1 N сярна киселина (4.6) и 0, 2, 4, 6, 8 и 10 ml разтвор на калиев дихидроген фосфат (4.7) съответно и се допълва до означението 20 ml с дестилирана вода (4.1).

7.2.3.2. Запушва се с хлабава запушалка, разклаща се и се нагрева във вана с вряща вода (5.7) за 10 минути, след това се охлажда в 20 °C водна баня (5.4) за 20 минути и се анализира спектрофотометрично (5.12) в 1 сантиметрова епруветка (5.13) при 420 nm спрямо разтвора за сравнение (7.2.1.4).

7.2.3.3. Построяване на калибрационната крива:

разтвор на дихидроген фосфат (ml) 0 2 4 6 8 10

P₂O₅ (mg) 0 0,167 0,334 0,501 0,668 0,835

8. Изразяване на резултати

Съдържанието на яйчен жълтък в г/л се изчислява по следната формула:

$$\text{g/l яйчен жълтък} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{плътност}}{\text{Е}/40}$$

където:

110 коефициент на конверсия за общо P_2O_5 в g в 100 g яйчен жълтък
 mg P_2O_5 стойност, установена от калибрационната крива
 плътност маса за единица обем (g/ml) на ликьор на яйчна основа при 20 °C
 Е тегло на ликьора на яйчна основа в g
 40 коефициент на разтваряне за 5 ml кратен на разтвор на пепел.

9. Характеристики на работа на метода (точност)

Статистически резултати от вътрешнолабораторния тест:

Следната таблица представя стойностите за яйчен жълтък.

Следващите данни са получени от международно изучаване на работата на метода, направено съобразно международно съгласувани процедури.

Година на вътрешнолабораторния тест 1998 г.

Брой на лабораториите 24

Брой на пробите 5

Аналит: яйчен жълтък

Проби	А	Б	В	Г	Д
Брой на лабораториите, ангажирани след отстраняването на отделените слоеве	19	20	22	20	22
Брой на отделените слоеве (лаборатории)	3	4	2	4	2
Брой на приетите резултати	38	40	44	40	44
Средна стойност	147,3	241,1	227,4	51,9(*) 72,8(*)	191,1
Стандартно отклонение на повтаряемост (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Относително стандартно отклонение на повтаряемост (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Лимит на повтаряемост (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Стандартно отклонение на възпроизвеждане (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Относително стандартно отклонение на възпроизвеждане (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Лимит на възпроизвеждане (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Видове проби:

А Advocaat, еднообразни дубликати

Б Advocaat, еднообразни дубликати

В Advocaat, еднообразни дубликати

Г Advocaat, (разтворен), нива на разцепване(*)

Д Advocaat, еднообразни дубликати