

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2091/2002 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**της 26ης Νοεμβρίου 2002****για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2870/2000 για τον καθορισμό των κοινοτικών μεθόδων αναφοράς που εφαρμόζονται στις αναλύσεις στον τομέα των αλκοολούχων ποτών**

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

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

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2870/2000 της Επιτροπής, της 19ης Δεκεμβρίου 2000, για τον καθορισμό των κοινοτικών μεθόδων αναφοράς που εφαρμόζονται στις αναλύσεις στον τομέα των αλκοολούχων ποτών ⁽²⁾, περιγράφει τις μεθόδους αυτές στο παράρτημά του.
- (2) Τέσσερις μέθοδοι ανάλυσης, που εφαρμόζονται στον προσδιορισμό της trans-ανηθόλης στα αρωματισμένα με άνισο αλκοολούχα ποτά, του γλυκυρριζικού οξέος και των χαλκόνων στα pastis και του κρόκου αυγού στα λικέρ με αυγά και με βάση τα αυγά, επικυρώθηκαν σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένα κριτήρια στο πλαίσιο ερευνητικής δράσης που υποστηρίχθηκε από την Επιτροπή.

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

Βρυξέλλες, 26 Νοεμβρίου 2002.

(3) Οι τέσσερις αυτές μέθοδοι μπορούν να αναγνωριστούν ως κοινοτικές μέθοδοι αναφοράς και πρέπει να προστεθούν στο παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2870/2000.

(4) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής εφαρμογής για τα αλκοολούχα ποτά,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2870/2000 τροποποιείται ως ακολούθως:

1. Στη σύνοψη του παραρτήματος, οι όροι «(p.m.)» στα σημεία V, VI, VII και IX καταργούνται.
2. Τα κεφάλαια V, VI, VII και IX του παραρτήματος του παρόντος κανονισμού προστίθενται μετά το κεφάλαιο III.

Άρθρο 2

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

Για την Επιτροπή

Franz FISCHLER

Μέλος της Επιτροπής

⁽¹⁾ ΕΕ L 160 της 12.6.1989, σ. 1.

⁽²⁾ ΕΕ L 333 της 29.12.2000, σ. 20.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

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

1. Πεδίο εφαρμογής

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

2. Σχετικά πρότυπα

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

3. Αρχή

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

4. Αντιδραστήρια και υλικά

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

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

4.1. Αιθανόλη 96 % vol. (CAS 64-17-5)

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

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

4.4. Αιθανόλη 45 % vol.

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

4.5. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

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

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

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

4.5.1. Πρότυπο διάλυμα Α

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

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

4.5.2. Εσωτερικό πρότυπο διάλυμα Β

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

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

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

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

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

- 4.5.4. Πρότυπο διάλυμα C

2 ml πρότυπου διαλύματος Α (4.5.1) μεταφέρονται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml. Προστίθενται 2 ml εσωτερικού πρότυπου διαλύματος Β (4.5.2), ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 45 % vol. (4.4) και το διάλυμα αναμειγνύεται καλώς.

5. Συσκευές και εξοπλισμός

- 5.1. Αέριος χρωματογράφος με τριχοειδή στήλη εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) και ολοκληρωτή ή οποιοδήποτε άλλο σύστημα επεξεργασίας δεδομένων με το οποίο να μπορούν να μετρώνται ύψη ή εμβαδά κορυφών, ως και με αυτόματο δειγματολήπτη ή χειροκίνητο σύστημα εισαγωγής δείγματος (manual sample injection).
- 5.2. Εισαγωγέας «Split/Splitless»
- 5.3. Τριχοειδής στήλη με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά, ενδεικτικώς:
μήκος: 50 m,
εσωτερική διάμετρος: 0,32 mm,
πάχος φιλμ: 0,2 μm,
στατική φάση: FFAP — πορώδες πολυμερές τροποποιημένης ΤΡΑ πολυαιθυλενογλυκόλης διασταυρούμενης σύνδεσης.
- 5.4. Κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός: ογκομετρικά γυάλινα σκεύη ποιότητας Α, αναλυτικός ζυγός (ακρίβεια: ± 0,1 mg).

6. Χρωματογραφικές συνθήκες

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

- 6.1. Φέρον αέριο: ήλιο αναλυτικής καθαρότητας.
- 6.2. Ταχύτητα ροής: 2 ml/min
- 6.3. Θερμοκρασία εισαγωγέα: 250 °C.
- 6.4. Θερμοκρασία ανιχνευτή: 250 °C.
- 6.5. Συνθήκες θερμοκρασίας κλιβάνου: ισοθέρμως στους 180 °C επί 10 λεπτά
- 6.6. Όγκος ένεσης: 1 μl, split 1:40

7. Δείγματα

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

8. Διαδικασία

- 8.1. Έλεγχος του δείγματος για τυχόν παρουσία εστραγκόλης

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

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

- 8.2. Παρασκευή άγνωστων δειγμάτων

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

8.3. Τυφλό

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

8.4. Έλεγχος γραμμικότητας

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

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

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

Ως γραφική παράσταση πρέπει να λαμβάνεται ευθεία γραμμή.

8.5. Προσδιορισμός

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

9. Υπολογισμός του συντελεστή απόκρισης

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

9.1. Υπολογισμός του συντελεστή απόκρισης (RF_i)

Ο συντελεστής απόκρισης υπολογίζεται ως εξής:

$$RF_i = (C_i / \text{εμβαδόν ή ύψος}_i) * (\text{εμβαδόν ή ύψος}_{is} / C_{is})$$

Όπου:

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

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

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

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

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

9.2. Ανάλυση των διαλυμάτων ελέγχου γραμμικότητας της απόκρισης

Εγχύονται τα διαλύματα ελέγχου γραμμικότητας της απόκρισης (4.5.3).

9.3. Ανάλυση του δείγματος

Εγχύεται το διάλυμα του άγνωστου δείγματος (8.2).

10. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

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

$$c_i = C_{is} * (\text{εμβαδόν ή ύψος}_i / \text{εμβαδόν ή ύψος}_{is}) * RF_i$$

Όπου:

c_i είναι η άγνωστη συγκέντρωση της trans-ανηθόλης

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

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

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

RF_i είναι ο συντελεστής απόκρισης (υπολογιζόμενος όπως στο 9.1)

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

11. Διασφάλιση και έλεγχος ποιότητας

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

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

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

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

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

12.1. Αρχή

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

12.2. Αντιδραστήρια και υλικά

Για την εκχύλιση χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια καθαρότητας άνω του 99 %.

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

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

12.3. Συσκευές και εξοπλισμός

Κωνικές φιάλες, διαχωριστικές χοάνες, ψύκτης.

12.4. Διαδικασία

12.4.1. Έλεγχος του δείγματος για τυχόν ύπαρξη εστραγκόλης

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

12.4.2. Εκχύλιση

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

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

Η πωματισμένη φιάλη τοποθετείται σε ψυγείο ($T < 5 \text{ }^\circ\text{C}$) επί δύο ώρες τουλάχιστον.

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

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

12.4.3. Προετοιμασία του εκχυλίσματος του δείγματος, προς ανάλυση

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

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

12.5. Προσδιορισμός

Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 8.5 ανωτέρω.

12.6. Υπολογισμός των Αποτελεσμάτων

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο τύπος:

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

Όπου:

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

V είναι ο όγκος του άγνωστου δείγματος (50 ml)

RF_i είναι ο συντελεστής απόκρισης (9.1)

εμβαδόν_i είναι το εμβαδόν της κορυφής της trans-ανηθόλης

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

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

12.7. Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας

Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 11 ανωτέρω.

13. Χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου (πιστότης)

Στατιστικά αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής:

Στους πίνακες που ακολουθούν δίδονται οι τιμές για την ανηθόλη.

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

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

Pastis:

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

Τύποι δειγμάτων:

A pastis, τυφλά εις διπλούν

B pastis, τυφλά εις διπλούν

C pastis, τυφλά εις διπλούν

- D pastis, τυφλά εις διπλούν
 E pastis, μονό εις απλούν
 F pastis, μονό εις απλούν

Άλλα αρωματισμένα με άνισο αλκοολούχα ποτά:

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

Τύποι δειγμάτων:

- G ούζο, επίπεδα split (*)
 H anis, τυφλά εις διπλούν
 I λικέρ αρωματισμένο με άνισο, εις διπλούν
 J λικέρ αρωματισμένο με άνισο, εις διπλούν

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

1. Πεδίο εφαρμογής

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

2. Σχετικά πρότυπα

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

3. Αρχή

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

4. Αντιδραστήρια και υλικά

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

- 4.1. Αιθανόλη 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Γλυκυρριζινικό αμμώνιο, $C_{42}H_{92}O_{16} \cdot NH_3$ (άλας αμμωνίου του γλυκυρριζικού οξέος) (M.B. 839.98) (CAS 53956-04-0): καθαρότητα τουλάχιστον 90 %.
(M.B. γλυκυρριζικού οξέος: 822.94)
- 4.3. Παγόμορφο οξικό οξύ, CH_3COOH (CAS 64-19-7)
- 4.4. Μεθανόλη, CH_3OH (CAS 67-56-1)
- 4.5. Αιθανόλη 50 % vol.
Για την παρασκευή 1 000 ml (σε 20 °C) χρησιμοποιούνται:
— αιθανόλη 96 % vol. (4.1): 521 ml
— νερό (2.0): 511 ml
- 4.6. Παρασκευή των διαλυμάτων έκλουσης HPLC
- 4.6.1. Διαλύτης έκλουσης Α (παράδειγμα)
80 μέρη (κατ' όγκο) νερό (2.0)
20 μέρη (κατ' όγκο) οξικό οξύ (4.3).
Ο διαλύτης έκλουσης απαερώνεται για πέντε λεπτά.
Σημείωση: Εάν το χρησιμοποιούμενο νερό δεν έχει διηθηθεί από μικροηθμό, συνιστάται η διήθηση του παρασκευαζόμενου διαλύτη έκλουσης μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες με μέγεθος πόρων μικρότερο ή ίσο με 0,45 μm.
- 4.6.2. Διαλύτης έκλουσης Β
Μεθανόλη (4.4).
- 4.7. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων
Όλα τα πρότυπα διαλύματα πρέπει να απορρίπτονται μετά παρέλευση δύο μηνών από την παρασκευή τους.
- 4.7.1. Διάλυμα αναφοράς C
Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, ζυγίζονται με προσέγγιση 0,1 mg, 25 mg γλυκυρριζινικού αμμωνίου (4.2). Προστίθεται μικρή ποσότητα αιθανόλης 50 % vol. (4.5) προς διάλυση του γλυκυρριζινικού αμμωνίου. Αφού αυτό διαλυθεί, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή, με αιθανόλη 50 % vol. (4.5).
Το προκύπτον διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες.
- 4.7.2. Πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της γραμμικότητας της απόκρισης των οργάνων
Παρασκευάζεται ένα αρχικό διάλυμα συγκεντρώσεως 1,0 g/l, ζυγίζοντας, με προσέγγιση 0,1 mg, 100 mg γλυκυρριζινικού αμμωνίου σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προστίθεται μικρή ποσότητα αιθανόλης 50 % vol. (4.5) προς διάλυση του γλυκυρριζινικού αμμωνίου. Αφού αυτό διαλυθεί, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 50 % vol. (4.5).
Παρασκευάζονται 4 άλλα διαλύματα γλυκυρριζινικού αμμωνίου με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,25 και 0,5 g/l ως εξής: σε τέσσερις ογκομετρικές φιάλες των 100 ml, φέρονται με σιφόνιο αντιστοίχως 5 ml, 10 ml, 25 ml και 50 ml αντιστοίχως από το αρχικό διάλυμα συγκεντρώσεως 1,0 g/l. Στη συνέχεια σε κάθε μία από αυτές συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 50 % vol. (4.5) και το όλον αναμειγνύεται καλώς.
Όλα τα διαλύματα διηθούνται μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες.
5. **Συσκευές και εξοπλισμός**
- 5.1. Σύστημα διαχωρισμού
- 5.1.1. Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης
- 5.1.2. Αντλία με δυνατότητα επίτευξης και διατήρησης σταθερής ή προγραμματισμένης ταχύτητας ροής με μεγάλη ακρίβεια.
- 5.1.3. Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής UV: ρύθμιση στα 254 nm.
- 5.1.4. Σύστημα απαέρωσης διαλυτών
- 5.2. Σύστημα ολοκλήρωσης με υπολογιστή ή καταγραφικό, συμβατό με το υπόλοιπο σύστημα.

- 5.3. Στήλη (παράδειγμα):
υλικό: ανοξείδωτος χάλυβας ή γυαλί
εσωτερική διάμετρος: 4-5 mm
μήκος: 100-250 mm
στατική φάση: αντίστροφη φάση δεκαοκτυλικών (C18) χαρακτηριστικών ομάδων (κατά προτίμηση σφαιρικών) διασταυρούμενης σύνδεσης επί διοξειδίου του πυριτίου (cross-linked silica with an octadecyl derived functional group), μέγιστο μέγεθος σωματιδίων: 5 μm.
- 5.4. Εργαστηριακός εξοπλισμός
- 5.4.1. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0,1 mg.
- 5.4.2. Ογκομετρικά γυάλινα σκεύη κατηγορίας A
- 5.4.3. Διάταξη διήθησης με μικρομεμβράνες για μικρούς όγκους

6. Χρωματογραφικές συνθήκες

- 6.1. Συνθήκες έκλουσης (παράδειγμα):
— ταχύτητα ροής: 1 ml/minute
— διαλύτης A = 30 %
— διαλύτης B = 70 %
- 6.2. ανίχνευση:
— UV = 254 nm

7. Διαδικασία

- 7.1. Προετοιμασία του δείγματος του αλκοολούχου ποτού
Το δείγμα διηθείται, αν χρειάζεται, μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες (διάμετρος πόρων: 0,45 μm).
- 7.2. Προσδιορισμός
Αφού σταθεροποιηθούν οι χρωματογραφικές συνθήκες:
— Εγχύονται 20 μl του διαλύματος αναφοράς C (4.7.1),
— Εγχύονται 20 μl του διαλύματος του δείγματος,
— τα δύο χρωματογραφήματα συγκρίνονται. Ταυτοποιούνται οι κορυφές του γλυκυρριζικού οξέος από τους χρόνους κατακράτησής τους. Μετρώνται τα εμβαδά (ή ύψη) τους και υπολογίζεται η συγκέντρωση σε g/l με δύο δεκαδικά ψηφία, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

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

όπου:

- c είναι η συγκέντρωση του γλυκυρριζικού οξέος σε γραμμάρια ανά λίτρο αλκοολούχου ποτού,
C είναι η συγκέντρωση γλυκυρριζικού αμμωνίου σε γραμμάρια ανά λίτρο στο διάλυμα αναφοράς,
H είναι το εμβαδόν (ή το ύψος) της κορυφής του γλυκυρριζικού οξέος του διαλύματος αναφοράς,
h είναι το εμβαδόν (ή το ύψος) της κορυφής του γλυκυρριζικού οξέος του αναλυμένου αλκοολούχου ποτού,
P είναι η καθαρότητα του γλυκυρριζικού αμμωνίου αναφοράς (σε %),
823 είναι το μοριακό βάρος του γλυκυρριζικού οξέος,
840 είναι το μοριακό βάρος του γλυκυρριζικού αμμωνίου.

8. Χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου (ακρίβεια)

Στατιστικά αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής:
Στον πίνακα που ακολουθεί, δίδονται οι τιμές για το γλυκυρριζικό οξύ.

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

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

Δείγματα	A	B	C	D	E
Αριθμός εργαστηρίων μετά την αφαίρεση των αποκλινοσών τιμών	13	14	15	16	16
Αριθμός αποκλινοσών τιμών (εργαστήρια)	3	2	1	—	—
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	26	28	30	32	32
Μέση τιμή g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_p) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_p) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Όριο επαναληψιμότητας (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Τύποι δειγμάτων:

- A pastis, τυφλά εις διπλούν
- B pastis, επίπεδα split (*)
- C pastis, τυφλά εις διπλούν
- D pastis, τυφλά εις διπλούν
- E pastis, τυφλά εις διπλούν

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

1. Πεδίο εφαρμογής

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

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

2. Σχετικά πρότυπα

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

3. Αρχή

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

4. Αντιδραστήρια και υλικά

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

- 4.1. Αιθανόλη 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Ακετονιτρίλιο, CH_3CN (CAS 75-05-8)

- 4.3. Ουσία αναφοράς: *Glycyrrhiza glabra* (γλυκόριζα)
Χονδροαλεσμένες γλυκόριζες (*Glycyrrhiza glabra*). Μέσες διαστάσεις των ραβδόμορφων σωματιδίων: μήκος: 10-15 mm πλάτος: 1-3 mm.
- 4.4. Οξικό νάτριο, CH₃COONa (CAS 127-09-3)
- 4.5. Παγόμορφο οξικό οξύ, CH₃COOH (CAS 64-19-7)
- 4.6. Παρασκευή διαλυμάτων
- 4.6.1. Αιθανόλη 50 % κ.ο.
Για 1 000 ml στους 20 °C:
— αιθανόλη 96 % vol. (4.1): 521 ml
— νερό (2.0): 511 ml
- 4.6.2. Διαλύτης Α: ακετονιτρίλιο
Ακετονιτρίλιο (4.2) αναλυτικής καθαρότητας για HPLC.
Απαέρωση
- 4.6.3. Διαλύτης Β: ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,1 M, pH 4.66
Σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml ζυγίζονται 8,203 g οξικού νατρίου (4.4), ακολούθως προστίθενται 6,005 g παγόμορφου οξικού οξέος (4.5) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 1 000 ml με νερό (2).

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

- 5.1. Ζυγίζονται 10 g χονδροαλεσμένης γλυκόριζας (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) και φέρονται σε φιάλη αποστάξεως με σφαιρικό πυθμένα.
— Προστίθενται 100 ml αιθανόλης 50 % vol. (4.6.1).
— Υποβάλλεται σε βρασμό υπό επαναρροή (με κάθετο ψυκτήρα) επί μία ώρα.
— Διηθείται.
— Το διήθημα φυλάσσεται για να χρησιμοποιηθεί αργότερα.
- 5.2. Παραλαμβάνεται από τον ηθμό το εκχύλισμα της γλυκόριζας
— Φέρεται σε φιάλη αποστάξεως με σφαιρικό πυθμένα.
— Προστίθενται 100 ml αιθανόλης 50 % vol. (4.6.1).
— Υποβάλλεται σε βρασμό υπό επαναρροή (με κάθετο ψυκτήρα) επί μία ώρα.
— Διηθείται. Το διήθημα φυλάσσεται για αργότερα.
- 5.3. Η εκχύλιση της γλυκόριζας πρέπει να εκτελείται τρεις φορές διαδοχικά.
- 5.4. Τα τρία διηθήματα (εκχυλίσματα) αναμειγνύονται.
- 5.5. Ο διαλύτης απομακρύνεται (από το 5.4) με εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα.
- 5.6. Το μετά την απομάκρυνση του διαλύτη υπόλειμμα του εκχυλίσματος (5.5) παραλαμβάνεται με 100 ml αιθανόλη 50 % vol. (4.6.1).

6. Συσκευές και εξοπλισμός

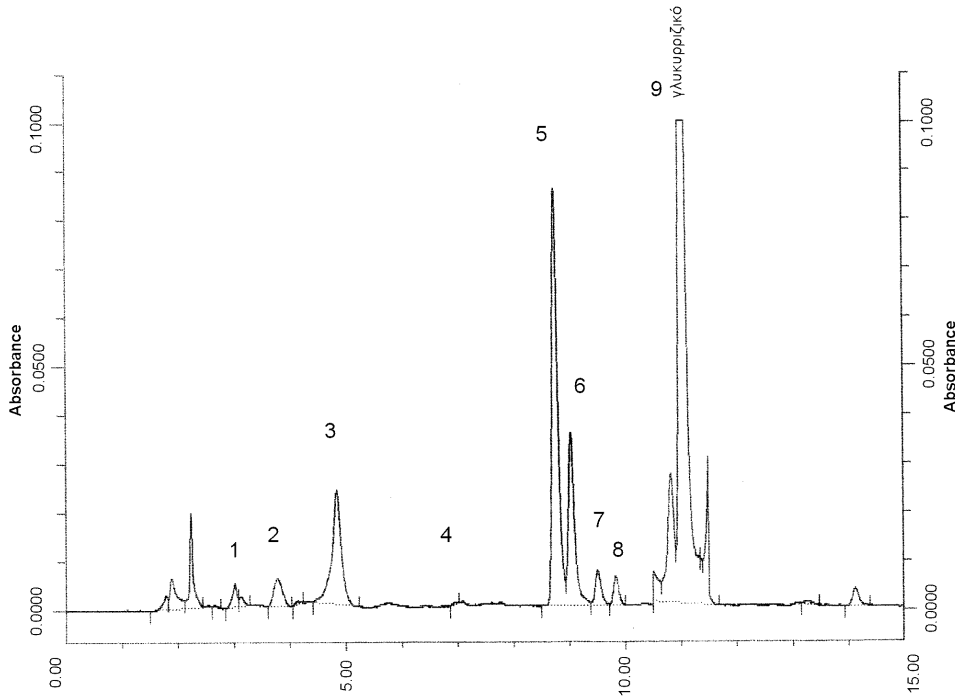
- 6.1. Σύστημα διαχωρισμού
- 6.1.1. Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης
- 6.1.2. Αντλία με δυνατότητα επίτευξης και διατήρησης σταθερής ή προγραμματισμένης ταχύτητας ροής σε υψηλή πίεση.
- 6.1.3. Σύστημα ανίχνευσης δια φασματοφωτομετρίας UV/ορατού, το οποίο μπορεί να ρυθμίζεται στα 254 και 370 nm.
- 6.1.4. Σύστημα απαέρωσης διαλυτών
- 6.1.5. Φούρνος στήλης, που να μπορεί να ρυθμίζεται σε θερμοκρασία 40 ± 0,1 °C.
- 6.2. Σύστημα ολοκλήρωσης με υπολογιστή ή καταγραφικό, συμβατό με το υπόλοιπο σύστημα.

- 6.3. Στήλη
- Υλικό: ανοξειδωτος χάλυβας ή γυαλί
- Εσωτερική διάμετρος: 4-5 mm
- Στατική φάση: αντίστροφη φάση δεκαοκτυλικών χαρακτηριστικών ομάδων (C18) διασταυρούμενης σύνδεσης επί διοξειδίου του πυριτίου (cross-linked silica with an octadecyl derived functional group), μέγεθος σωματιδίων: 5 μm κατά μέγιστο (cross-linked phase).
- 6.4. Κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός, στον οποίο περιλαμβάνονται:
- 6.4.1. Αναλυτικός ζυγός (ακρίβεια: ± 0,1 mg).
- 6.4.2. Συσκευή αποστάξεως με κάθετο ψυκτήρα, αποτελούμενη από π.χ.:
- φιάλη των 250 ml με σφαιρικό πυθμένα και τυποποιημένο εσμυρισμένο στόμιο σύνδεσης,
 - κάθετο ψυκτήρα μήκους 30 cm
 - πηγή θερμότητας (με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης, πρέπει να αποφεύγεται η οποιαδήποτε πυρόλυση του εκχυλίσματος).
- 6.4.3. Περιστροφική συσκευή εξάτμισης
- 6.4.4. Σύστημα διήθησης (δηλαδή χωνί Buchner)
- 6.5. Χρωματογραφικές συνθήκες (παράδειγμα)
- 6.5.1. Χαρακτηριστικά έκλουσης διαλυτών Α (4.6.2) και Β (4.6.3):
- διαβάθμιση από 20/80 (v/v) σε 50/50 (v/v) σε δεκαπέντε λεπτά
 - διαβάθμιση από 50/50 (v/v) σε 75/25 (v/v) σε πέντε λεπτά
 - ισοκρατικό στα 75/25 (v/v) για πέντε λεπτά
 - σταθεροποίηση της στήλης μεταξύ εγχύσεων:
 - ισοκρατικό στα 20/80 (v/v) για πέντε λεπτά.
- 6.5.2. Ταχύτητα ροής: 1 ml/λεπτό
- 6.5.3. Ρυθμίσεις ανιχνευτή UV:
- Ο ανιχνευτής πρέπει να ρυθμίζεται στα 370 nm για την ανίχνευση της παρουσίας χαλκονών και κατόπιν στα 254 nm για την ανίχνευση του γλυκυρρζικού οξέος.
- Σημείωση: Η αλλαγή του μήκους κύματος (από 370 nm σε 254 nm) πρέπει να γίνεται 30 δευτερόλεπτα πριν από την έναρξη εμφάνισης της κορυφής του εκλουόμενου γλυκυρρζικού οξέος.
7. **Διαδικασία**
- 7.1. Προετοιμασίας του δείγματος του αλκοολούχου ποτού
- Το δείγμα διηθείται μέσω ηθμού για οργανικούς διαλύτες (διάμετρος πόρων: 0,45 μm).
- 7.2. Προετοιμασία του συμπυκνωθέντος εκχυλίσματος γλυκόρριζας (5.6)
- Πριν από την ανάλυση, γίνεται αραιώση 1 προς 10 με αιθανόλη 50 % vol. (4.6.1)
- 7.3. Προσδιορισμός
- 7.3.1. Εγχύονται 20 ml του παρασκευασθέντος εκχυλίσματος γλυκόρριζας (7.2). Εκτελείται η ανάλυση υπό τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω (6.5).
- 7.3.2. Εγχύονται 20 ml του δείγματος (7.1). (Δείγμα αλκοολούχου ποτού αρωματισμένου με άνισο). Εκτελείται η ανάλυση υπό τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω (6.5).
- 7.3.3. Τα δύο χρωματογραφήματα συγκρίνονται. Πρέπει να υπάρχει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δύο χρωματογραφημάτων στη ζώνη εξόδου των χαλκονών (κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης στα 370 nm υπό τις περιγραφείσες ανωτέρω συνθήκες αναλύσεως) (βλέπε εικόνα 1).

8. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα για *pastis*

Εικόνα 1

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



9. Χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου (ακρίβεια)

Αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής:

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

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

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

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

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

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

Τύποι δειγμάτων:

- A pastis, τυφλά εις διπλούν
- B pastis, δείγμα εις απλούν
- C pastis, δείγμα εις απλούν
- D «pastis» (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν
- E «pastis» (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν
- F λικέρ αρωματισμένο με άνισο (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν
- G λικέρ αρωματισμένο με άνισο (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν
- H ούζο (μη περιέχον χαλκόνες), δείγμα εις απλούν
- I ούζο (μη περιέχον χαλκόνες), δείγμα εις απλούν
- J apis (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν
- K «pastis» (μη περιέχον χαλκόνες), τυφλά εις διπλούν

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

1. Πεδίο εφαρμογής

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

2. Σχετικά πρότυπα

ISO 3696:1997 Νερό αναλυτικής καθαρότητας — Προδιαγραφές και μέθοδοι ανάλυσης.

3. Αρχή

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

4. Αντιδραστήρια και υλικά

- 4.1. Δισαπεσταγμένο νερό
- 4.2. Γη διατόμων
- 4.3. Αιθανόλη 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.4. Διάλυμα οξικού μαγνησίου 15 % (CAS 16674-78-5)
- 4.5. Διάλυμα θειικού οξέος 10 % (CAS 7664-93-9)

- 4.6. Διάλυμα θειικού οξέος 1 N
- 4.7. Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου KH_2PO_4 (CAS 778-77-0) 0,16 g/l
- 4.8. Αντιδραστήριο για τον προσδιορισμό των φωσφορικών:
20 g μολυβδαινικού αμμωνίου (CAS 12054-85-2), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 400 ml νερό στους 50 °C.
Σε άλλο δοχείο, διαλύεται 1 g βαναδικού αμμωνίου (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3 , σε 300 ml ζεστό νερό, αφήνεται να ψυχθεί και κατόπιν προστίθενται 140 ml πυκνού νιτρικού οξέος (CAS 7697-37-2). Τα διαλύματα, αφού ψυχθούν, αναμειγνύονται σε ογκομετρική φιάλη 1 000 ml και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή των 1 000 ml.
5. **Συσκευές και εξοπλισμός**
- 5.1. Κωνική φιάλη 100 ml
- 5.2. Λουτρό υπερήχων (ή μαγνητικός αναδευτήρας)
- 5.3. Ογκομετρική φιάλη 100 ml
- 5.4. Υδρόλουτρο 20 °C
- 5.5. Ηθμός (Whatman 4 ή ισοδύναμο)
- 5.6. Χωνευτήριο πορσελάνης (ή πλατίνας)
- 5.7. Λουτρό ζέοντος ύδατος
- 5.8. Θερμαντική πλάκα
- 5.9. Κλίβανος αποτέφρωσης
- 5.10. Ογκομετρική φιάλη 50 ml
- 5.11. Ογκομετρική φιάλη 20 ml
- 5.12. Φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο στα 420 nm
- 5.13. Κυψελίδα 1 cm.
6. **Δείγματα**
- Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να αναλυθούν.
7. **Διαδικασία**
- 7.1. Ετοιμασία του δείγματος
- 7.1.1. Ζυγίζονται 10 g δείγματος σε κωνική φιάλη 100 ml (5.1).
- 7.1.2. Προστίθενται βαθμιαία, σε μικρές ποσότητες, 70 ml απόλυτης αιθανόλης (4.3), αναδεύοντας μετά από κάθε προσθήκη, και φέρουμε σε λουτρό υπερήχων (5.2) για 15 λεπτά [ή αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα (5.2) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου].
- 7.1.3. Το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται ποσοτικά με απόλυτη αιθανόλη (4.3) σε ογκομετρική φιάλη 100 ml (5.3). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με απόλυτη αιθανόλη (4.3) και η φιάλη τοποθετείται σε υδρόλουτρο 20 °C (5.4). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή στους 20 °C.
- 7.1.4. Προστίθεται μικρή ποσότητα γης διατόμων (4.2) και το μείγμα διηθείται (5.5), απορριπτόμενων των πρώτων 20 ml.
- 7.1.5. 25 ml του διηθήματος μεταφέρονται σε χωνευτήριο πορσελάνης (ή πλατίνας) (5.6). Το διήθημα συμπυκνώνεται με ήπια εξάτμιση σε λουτρό ζέοντος ύδατος (5.7), μετά από την προσθήκη 5 ml διαλύματος οξικού μαγνησίου 15 % (4.4).
- 7.1.6. Το χωνευτήριο τοποθετείται σε θερμαντική πλάκα (5.8) και θερμαίνεται σχεδόν μέχρι ξηρού.
- 7.1.7. Το υπόλειμμα αποτεφρώνεται με πύρωση στους 600 °C σε κλίβανο αποτέφρωσης (5.9), μέχρις ότου η τέφρα γίνει λευκή. Χρειάζεται τουλάχιστον μιάμιση ώρα, μπορεί όμως να αφηθεί και όλη τη νύχτα.
- 7.1.8. Η τέφρα παραλαμβάνεται με 10 ml θειικού οξέος 10 % (4.5) και μεταφέρεται ποσοτικά δι' εκπλύσεως με απεσταγμένο νερό (4.1) σε ογκομετρική φιάλη 50 ml (5.10). Στη συνέχεια η φιάλη πληροúται, σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό (4.1). Από το προκύπτον αυτό διάλυμα της τέφρας λαμβάνεται ποσότητα 5 ml για την παρασκευή του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί ως δείγμα για τη φασματοφωτομετρική εξέταση των φωσφορικών.
- 7.2. Φασματοφωτομετρική εξέταση των φωσφορικών
- 7.2.1. Διάλυμα σύγκρισης
- 7.2.1.1. 10 ml διαλύματος θειικού οξέος 10 % (4.5) φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (5.10) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό (4.1).

- 7.2.1.2. 5 ml από το παραπάνω διάλυμα (7.2.1.1) φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml (5.11) προστίθενται 1 ml θειικού οξέος 1 N (4.6) και 2 ml του αντιδραστηρίου φωσφορικών (4.8) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό (4.1).
- 7.2.1.3. Η φιάλη πωματίζεται χαλαρά, ανακινείται και θερμαίνεται λουτρό ζέοντος ύδατος (5.7) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ψύχεται σε υδρόλουτρο 20 °C (5.4) για 20 λεπτά.
- 7.2.1.4. Μια κυψελίδα του 1 cm (5.13) πληρούται με αυτό το διάλυμα σύγκρισης.
- 7.2.2. Διάλυμα δείγματος
- 7.2.2.1. 5 ml από το διάλυμα της τέφρας (7.1.8) φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml (5.11), προστίθεται 1 ml θειικού οξέος 1 N (4.6) και 2 ml του αντιδραστηρίου φωσφορικών (4.8) και συμπληρώνεται ο όγκος, μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό (4.1).
- 7.2.2.2. Η φιάλη πωματίζεται χαλαρά ανακινείται και θερμαίνεται σε λουτρό ζέοντος ύδατος (5.7) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ψύχεται σε υδρόλουτρο 20 °C (5.4) για 20 λεπτά.
- 7.2.2.3. Το προκύπτον, κιτρίνου χρώματος διάλυμα φέρεται σε κυψελίδα του 1 cm (5.13) και εξετάζεται αμέσως φασματοφωτομετρικά (5.12) στα 420 nm ως προς το διάλυμα σύγκρισης (7.2.1.4).
- 7.2.3. Καμπύλη αναφοράς.
- 7.2.3.1. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, σε κάθε μία από τις έξι ογκομετρικές φιάλες των 20 ml μεταφέρεται 1 ml θειικού οξέος 1 N (4.6), κατόπιν προστίθενται 2 ml του φωσφορικού αντιδραστηρίου (4.8) και αντιστοίχως 0, 2, 4, 6, 8 και 10 ml από το διάλυμα του δισόξινου φωσφορικού καλίου (4.7) και ο όγκος συμπληρώνεται, μέχρι τη χαραγή, με απεσταγμένο νερό (4.1).
- 7.2.3.2. Η κάθε μια από τις παραπάνω φιάλες πωματίζεται χαλαρά, ανακινείται και θερμαίνεται σε λουτρό ζέοντος ύδατος (5.7) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ψύχεται σε υδρόλουτρο 20 °C (5.4) για 20 λεπτά και το περιεχόμενο σ' αυτή διάλυμα φέρεται σε κυψελίδα του 1 cm (5.13) και εξετάζεται φασματοφωτομετρικά (5.12) στα 420 nm ως προς το διάλυμα σύγκρισης (7.2.1.4).

- 7.2.3.3. Κατασκευή της καμπύλης αναφοράς:

Δισόξινο φωσφορικό διάλυμα (ml)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. Έκφραση των αποτελεσμάτων

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

$$\text{g/l κρόκου αυγού} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{πυκνότητα}}{E/40}$$

όπου:

- 110 συντελεστής μετατροπής για το συνολικό P₂O₅ σε g σε 100 g κρόκου αυγού,
 mg P₂O₅ η τιμή η προσδιοριζόμενη από την καμπύλη αναφοράς,
 πυκνότητα η μάζα ανά μονάδα όγκου (g/ml) του με βάση τα αυγά λικέρ στους 20 °C,
 E το βάρος του με βάση τα αυγά λικέρ σε g,
 40 ο συντελεστής αραιώσης για ποσότητα 5 ml διαλύματος τέφρας.

9. Χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου (πιστότης)

Στατιστικά αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής:

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

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

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

Δείγματα	A	B	C	D	E
Αριθμός εργαστηρίων μετά την αφαίρεση των αποκλινοσών τιμών	19	20	22	20	22
Αριθμός αποκλινοσών τιμών (εργαστήρια)	3	4	2	4	2
Αριθμός αποδεκτών αποτελεσμάτων	38	40	44	40	44
Μέση τιμή	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (S_p) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας (RSD_p) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Όριο επαναληψιμότητας (t) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Όριο αναπαραγωγιμότητας (R) g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Τύποι δειγμάτων:

- A Advocaat, τυφλά εις διπλούν
- B Advocaat, τυφλά εις διπλούν
- C Advocaat, τυφλά εις διπλούν
- D Advocaat (αραιωμένο), επίπεδα split (*)
- E Advocaat, τυφλά εις διπλούν.