

To besedilo je zgolj informativne narave in nima pravnega učinka. Institucije Unije za njegovo vsebino ne prevzemajo nobene odgovornosti. Verodostojne različice zadevnih aktov, vključno z uvodnimi izjavami, so objavljene v Uradnem listu Evropske unije. Na voljo so na portalu EUR-Lex. Uradna besedila so neposredno dostopna prek povezav v tem dokumentu

► **B**

UREDBA KOMISIJE (ES) št. 2870/2000
z dne 19. decembra 2000,
o določitvi referenčnih metod Skupnosti za analizo žganih pijač
(UL L 333, 29.12.2000, str. 20)

spremenjena z:

		Uradni list		
		št.	stran	datum
► <u>M1</u>	Uredba Komisije (ES) št. 2091/2002 z dne 26. novembra 2002	L 322	11	27.11.2002
► <u>M2</u>	Izvedbena uredba Komisije (EU) 2016/635 z dne 22. aprila 2016	L 108	1	23.4.2016
► <u>M3</u>	Izvedbena uredba Komisije (EU) 2023/383 z dne 16. februarja 2023	L 53	3	21.2.2023

popravljen z:

- **C1** Popravek, UL L 200, 10.8.2023, str. 48 (2870/2000)

▼B**UREDBA KOMISIJE (ES) št. 2870/2000****z dne 19. decembra 2000,****o določitvi referenčnih metod Skupnosti za analizo žganih pijač***Člen 1*

Referenčne metode Skupnosti za analizo žganih pijač, s katerimi se zagotavlja skladnost z Uredbo (EGS) št. 1576/89 in Uredbo (EGS) št. 1014/90:

— ko se opravlja kateri koli uradni nadzor ali

— ob sporu,

so tiste, ki so navedene v Prilogi k tej uredbi.

▼M3*Člen 1a*

1. Ta uredba se uporablja za etanol kmetijskega porekla, kot je opredeljen v členu 5 Uredbe (EU) 2019/787 Evropskega parlamenta in Sveta ⁽¹⁾.

2. Referenčne metode Unije za analizo etanola kmetijskega porekla so določene v Prilogi k tej uredbi.

3. Za namene te uredbe se etanol kmetijskega porekla šteje za destilat, katerega volumenski delež alkohola se meri neposredno, kakor je določeno v Dodatku II k poglavju I Priloge.

Kadar pa vzorec alkohola ni bister ali so vidni lebdeči delci, se vzorec destilira.

4. Za določanje hlapnih snovi je potrebno umerjanje s standardno raztopino C, pripravljeno v absolutnem etanolu, da se doseže ustrezno ujemanje matriksa med vzorci in standardnimi raztopinami, kot je podrobno opisano v poglavju III.2 Priloge.

⁽¹⁾ Uredba (EU) 2019/787 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 17. aprila 2019 o opredelitvi, opisu, predstavitvi in označevanju žganih pijač, uporabi imen žganih pijač pri predstavitvi in označevanju drugih živil, zaščiti geografskih označb žganih pijač, uporabi etanola in destilatov kmetijskega porekla v alkoholnih pijačah ter o razveljavitvi Uredbe (ES) št. 110/2008 (UL L 130, 17.5.2019, str. 1).

▼M3

5. Za določanje furfurala, kakor je podrobno opisano v poglavju X Priloge, se etanol kmetijskega porekla dvakratno razredči z dodajanjem vode, tako da se njegov začetni volumen podvoji in doseže volumenski delež alkohola, ki je združljiv z raztopinami za umerjanje. Rezultati za analizo furfurala se pretvorijo v grame na hektoliter 100 vol. % alkohola po enačbi „koncentracija furfurala v gramih na hektoliter 100 vol. % alkohola = koncentracija furfurala v mg/l \times 10/volumenski delež alkohola (vol. %)“, pri čemer je volumenski delež alkohola (vol. %) vsebnost alkohola izmerjenega vzorca iz poglavja I Priloge.

6. Za določanje vsebnosti ^{14}C v etanolu se uporablja metoda iz poglavja XI Priloge.

▼B*Člen 2*

Ne glede na prvo alineo člena 1 so ob odgovornosti direktorja laboratorija dovoljene druge analizne metode pod pogojem, da sta točnost in natančnost (ponovljivost in obnovljivost) metod vsaj enaki kakor pri ustreznih referenčnih analiznih metodah, danih v Prilogi.

Člen 3

Kadar za določanje in ugotavljanje vsebnosti snovi v žgani pijači niso predpisane referenčne analizne metode Skupnosti, se uporabljajo naslednje metode:

- (a) analizne metode, ki so validirane kot mednarodno priznani postopki in ki zlasti izpolnjujejo merila iz Priloge k Direktivi 85/591/EGS;
- (b) analizne metode, ki ustrezajo priporočenim standardom Mednarodne organizacije za standardizacijo (ISO);
- (c) analizne metode, ki jih je priznala generalna skupščina Mednarodnega urada za trto in vino (OIV) in jih je objavil ta urad;
- (d) če zaradi točnosti, ponovljivosti in obnovljivosti ni metode, kakor je navedeno pod (a), (b) ali (c):

— analizna metoda, ki jo potrdi zadevna država članica,

— kadar je potrebno, katera koli ustrezna analizna metoda.

Člen 4

V tej uredbi pomeni:

- (a) „meja ponovljivosti“: vrednost, manjšo ali enako vrednosti, ki se kot absolutna razlika med dvema preskusnima rezultatoma, dobljenima pod pogoji ponovljivosti (isti izvajalec, ista oprema, isti laboratorij in kratek časovni presledek) lahko pričakuje s 95-odstotno verjetnostjo {ISO 3534-1};

▼B

- (b) „meja obnovljivosti“: vrednost, manjšo ali enako vrednosti, ki se kot absolutna razlika med dvema preskusnima rezultatoma, dobljenima pod pogoji obnovljivosti (različna izvajalca, različna oprema, različna laboratorija) lahko pričakuje s 95-odstotno verjetnostjo {ISO 3534-1};
- (c) „točnost“: doseženo ujemanje med rezultatom preskusa in sprejeto referenčno vrednostjo {ISO 3534-1}.

Člen 5

Ta uredba začne veljati sedmi dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

Uporablja se od 1. januarja 2001.

Uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

▼ B*PRILOGA***OPIS REFERENČNIH ANALIZNIH METOD**

- I. Dodatek I: Priprava destilata Dodatek II: Merjenje gostote destilata
 - Metoda A = piknometrija
 - Metoda B = elektronska denzimetrija
 - Metoda C = hidrostatska tehnica
- II. Določanje skupnega suhega ekstrakta z gravimetrijo
- III. Določanje hlapnih snovi in metanola
 - III.1 Splošne opombe
 - III.2 Hlapne snovi: aldehidi, višji alkoholi, etilacetat in metanol (plinska kromatografija)
 - III.3 Hlapne kisline ► **M2** ————— ◀
- IV. Cianovodikova kislina (p.m.)
- V. Anetol ► **M1** ————— ◀
- VI. Glicirizinska kislina ► **M1** ————— ◀
- VII. Halkoni ► **M1** ————— ◀
- VIII. Skupni sladkorji ► **M2** ————— ◀
- IX. Jajčni rumenjaki ► **M1** ————— ◀

▼ M2

- X. Določanje spojin, vsebovanih v lesu: furfural, 5-hidroksimetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilin, siringaldehid, koniferaldehid, sinapaldehid, galna kislina, elagična kislina, vanilinska kislina, siringinska kislina in skopoletin

▼ M3

- XI. Določanje vsebnosti ¹⁴C v etanolu

▼B**I. DOLOČANJE VSEBNOSTI ALKOHOLA V VOLUMSKIH ODSOTKIH V ŽGANIH PIJAČAH****Uvod**

Referenčna metoda vključuje dva dodatka:

Dodatek I: Priprava destilata

Dodatek II: Merjenje gostote destilata

1. Področje uporabe

Metoda je primerna za določanje dejanske volumske vsebnosti alkohola v žganih pijačah.

2. Normativne reference

ISO 3696:1987: Voda za laboratorijske analize – specifikacije in preskusne metode.

3. Izrazi in opredelitev pojmov**3.1 Referenčna temperatura:**

Referenčna temperatura za določanje volumske vsebnosti alkohola v žganih pijačah, gostote in relativne gostote je 20 °C.

Opomba 1: Izraz „pri t °C“ je namenjen za vsa določanja (gostote ali volumske vsebnosti alkohola), izražena s temperaturo, ki ni referenčna temperatura 20 °C.

3.2 Gostota:

Gostota je masa žganih pijač na enoto prostornine pri 20 °C v vakuumu. Izraža se v kilogramih na kubični meter, njen simbol pa je $\rho_{20\text{ °C}}$ ali ρ_{20} .

3.3 Relativna gostota:

Relativna gostota je z decimalnim številom izraženo razmerje med gostoto žgane pijače pri 20 °C in gostoto vode pri isti temperaturi. Označuje se z oznako $d_{20\text{ °C}/20\text{ °C}}$ ali $d_{20/20}$ ali preprosto z d, kadar ni možnosti zamenjave. Izmerjeni parameter je v certifikatu lahko naveden samo z zgoraj opredeljenimi simboli.

Opomba 2: Relativno gostoto je mogoče dobiti iz gostote ρ_{20} pri 20 °C:

$$\rho_{20} = 998,203 \text{ kg/m}^3 d_{20/20} \text{ ali } d_{20/20} = \rho_{20}/998,203$$

pri čemer je 998,203 kg/m³ gostota vode pri 20 °C.

3.4 Dejanska volumska vsebnost alkohola:

Dejanska volumska vsebnost alkohola žganih pijač je enaka številu litrov etilnega alkohola v 100 litrih vodno-alkoholne zmesi, ki ima isto gostoto kakor alkohol ali žganje po destilaciji. Uporabiti je treba referenčne vrednosti za razmerje med volumsko vsebnostjo alkohola (vol %) pri 20 °C in gostoto različnih vodno-alkoholnih zmesi pri 20 °C, danih v mednarodni tabeli, ki jo je sprejela Mednarodna organizacija za zakonsko meroslovje v Priporočilu št. 22.

Splošna enačba, ki zadeva volumsko vsebnost alkohola in gostoto vodno-alkoholne zmesi pri dani temperaturi, je dana na strani 40 v poglavju 3 „Volumska vsebnost alkohola“ Priloge k Uredbi Komisije (EGS) št. 2676/90 (UL L 272, 3.10.1990, str. 1) ali v Priročniku analiznih metod Mednarodnega urada za vinsko trto in vino (1994) (str. 17).

▼ B

Opomba 3: Za likerje in kremne pijače, pri katerih je težko točno izmeriti prostornino, je treba vzorec stehtati in najprej izračunati masno vsebnost alkohola.

Formula za pretvorbo:

$$\text{volumska vsebnost alkohola (vol \%)} = \frac{\text{AMS (\% mase)} \cdot \rho_{20}(\text{vzorec})}{\rho_{20}(\text{alkohol})}$$

pri čemer je

AMS = masna vsebnost alkohola,

$\rho_{20}(\text{alkohol}) = 789,23 \text{ kg/m}^3$

4. Princip

Po pripravi destilata se volumska vsebnost alkohola v destilatu določa s piknometrijo, elektronskim denzimetrom ali hidrostatsko tehtnico.

▼B

DODATEK I: PRIPRAVA DESTILATA

1. Področje uporabe

Metoda je primerna za pripravo destilatov, pri katerih se določa dejanska volumska vsebnost alkohola v žganih pijačah.

2. Princip

Žgane pijače se destilirajo tako, da se etilni alkohol in druge hlapne spojine ločijo od ekstrakcijske snovi (snovi, ki se ne destilirajo).

3. Reagenti in materiali

3.1 Vrelni kamenčki.

3.2 Koncentrirana emulzija proti penjenju (za kremne likerje).

4. Aparatura in oprema

Običajna laboratorijska aparatura in zlasti naslednje.

4.1 Vodna kopel, ki jo je mogoče vzdrževati pri 10 °C do 15 °C.

Vodna kopel, ki jo je mogoče vzdrževati pri 20 °C ($\pm 0,2$ °C).

4.2 Merilne bučke (100 ml in 200 ml) razreda A, certificirane za 0,1 % in 0,15 % natančnost.

4.3 Aparatura za destilacijo:

4.3.1 Splošne zahteve

Aparatura za destilacijo mora izpolnjevati naslednje zahteve:

— število spojev ne sme presežati strogega minimuma, ki je potreben za neprepustnost sistema,

— vključevati mora sestavni del, ki preprečuje kipenje (izguba vrelnih tekočin) in uravnava hitrost destilacije z alkoholom nasičenih hlapov,

— hitro in popolno mora kondenzirati alkoholne hlape,

— prve destilacijske frakcije mora zbrati v vodi.

Vir toplote je treba opremiti s primernim pripomočkom za razporejanje toplote, ki naj prepreči vsakršno pirogeno reakcijo nepredestiliranih snovi.

4.3.2 Primer ustrezne destilacijske aparature je prikazan na sliki 1, vključeni pa so naslednji deli:

— bučka, 1 liter, z okroglim dnom in s standardiziranim obrušom,

— rektifikacijska kolona, visoka vsaj 20 cm (na primer Vigreuxova kolona),

— upognjeni konektor s približno 10-centimetrskim ravnim hladilnikom (tipa West), nameščenim navpično,

— vijačni hladilnik, dolg 40 cm,

— cevasti nastavek, po katerem steče destilat na dno umerjene zbiralne bučke z malo vode.

Opomba: Zgoraj opisana aparatura je namenjena vzorcem s prostornino vsaj 200 ml. Manjši vzorec (100 ml) pa se lahko destilira v manjši destilacijski bučki pod pogojem, da se uporabi sredstvo, ki preprečuje kipenje, ali kak drug ustrezen pripomoček.

▼ B**5. Hranjenje preskusnih vzorcev**

Vzorci se pred analizo hranijo pri sobni temperaturi.

6. Postopek

Uvodna pripomba:

Destilirati je mogoče tudi po postopku, ki ga je objavil IUPAC (1968).

6.1 Preverjanje destilacijske aparature.

Aparatura mora izpolnjevati naslednje zahteve:

Destilacija 200 ml vodno-alkoholne zmesi z znano koncentracijo blizu 50 vol % ne sme povzročiti izgube alkohola za več kakor 0,1 vol %.

6.2 Žgane pijače z volumsko vsebnostjo alkohola pod 50 vol %.

V merilno bučko odmerimo 200 ml žganja.

Zapišemo temperaturo te tekočine ali vzdržujemo stalno temperaturo (20 °C).

Vzorec nalijemo v bučko, ki ima okroglo dno, destilacijskega aparata in splaknemo merilno bučko s tremi alikvotnimi deli po približno 20 ml destilirane vode. Vsak odmerek vode za splakovanje dodamo vsebini destilacijske bučke.

Opomba: Teh 60 ml raztopine zadošča za žganja, ki vsebujejo manj kakor 250 g suhega ekstrakta na liter. Če je koncentracija suhega ekstrakta 300 g/l, mora biti vode za splakovanje zaradi preprečevanja pirolize vsaj 70 ml, za 400 g/l suhega ekstrakta 85 ml in za 500 g/l suhega ekstrakta (nekateri sadni ali kremni likerji) 100 ml. Prostornino sorazmerno prilagodimo različnim prostorninam vzorca.

Dodamo nekaj vrelnih kamenčkov (3.1) (kremnim likerjem tudi sredstvo proti penjenju).

Nalijemo 20 ml destilirane vode v pripravljeno 200-mililitrsko merilno bučko, v kateri se bo nabiral destilat. Bučko potem postavimo v hladno vodno kopel (4.1) (10 do 15 °C za žgane pijače, odišavljene z janežem).

Destiliramo in pazimo, da ne nastopi škropljenje in zогlenitev, občasno premešamo vsebino, dokler ne sega destilat nekaj milimetrov pod oznako merilne bučke.

Ko se temperatura destilata približa začetni temperaturi na najmanj 0,5 °C, dopolnimo do oznake z destilirano vodo in temeljito premešamo.

Ta destilat se uporablja za določanje volumske vsebnosti alkohola (Dodatek II)

6.3 Žgane pijače z volumsko vsebnostjo alkohola nad 50 vol %.

Odmerimo 100 ml žgane pijače v 100-mililitrsko merilno bučko in izlijemo v destilacijsko bučko z okroglim dnom.

Merilno bučko večkrat splaknemo z destilirano vodo in to dodamo vsebini destilacijske bučke. Uporabimo dovolj vode, da bo v bučki približno 230 ml vsebine.

▼B

V 200-mililitrsko bučko, v katero se bo stekal destilat, nalijemo 20 ml destilirane vode. Potem jo postavimo v mrzlo vodno kopel (4.1) (10 do 15 °C za žganja, odišavljena z janežem).

Destiliramo, občasno premešamo vsebino bučke, dokler ne sega destilat nekaj milimetrov pod oznako 200-mililitrske merilne bučke.

Ko se temperatura destilata približa začetni temperaturi na najmanj 0,5 °C, dopolnimo do oznake z destilirano vodo in dobro premešamo.

Ta destilat se uporablja za določanje volumske vsebnosti alkohola (Dodatek II)

Opomba: Volumska vsebnost alkohola žgane pijače je enaka dvakratni vrednosti alkoholne vsebnosti v destilatu.

▼B

DODATEK II: MERJENJE GOSTOTE DESTILATA

METODA A: DOLOČANJE DEJANSKE VSEBNOSTI ALKOHOLA V ŽGANIH PIJAČAH – MERJENJE S PIKNOMETRIJO**A.1 Princip**

Volumska vsebnost alkohola se izračuna iz gostote destilata, izmerjene s piknometrijo.

A.2 Reagenti in materiali

Če ni drugače navedeno, uporabljamo za analizo samo reagente priznane analizne kakovosti in vodo najmanj kakovostne stopnje 3, kakor je to opredeljeno v ISO 3696:1987.

A.2.1 Raztopina natrijevega klorida (2 % w/v)

Za pripravo 1 litra odtehtamo 20 g natrijevega klorida in ga raztopimo v vodi, da dobimo 1 l raztopine.

A.3 Aparatura in oprema

Običajna laboratorijska aparatura in zlasti naslednje:

A.3.1 Analitska tehtnica z natančnostjo 0,1 mg.**A.3.2 Termometer z brusom in merilno skalo v desetinah stopinje od 10 do 30 °C. Ta termometer mora biti certificiran ali preverjen s certificiranim termometrom.****A.3.3 Pireks piknometer s približno 100 ml prostornine, opremljen z odstranljivim termometrom z brusom (A.3.2). Piknometer ima 25-milimetrsko stransko cevko z notranjim premerom (največ) 1 mm, ki se konča s koničnim brusom. Drugi piknometri so opisani v standardu ISO 3507, če je to primerno, se lahko uporabi na primer 50-mililitrski.****A.3.4 Primerjalna (tara) steklenička z enako zunanjo prostornino (do 1 ml razlike) kakor piknometer in z enako maso, kakor jo ima piknometer, ki je napolnjen s tekočino gostote 1,01 (raztopina natrijevega klorida A.2.1).****A.3.5 Termoizolirana obloga, ki se točno prilega piknometru.**

Opomba 1: Metoda določanja gostote žganih pijač v vakuumu zahteva uporabo dvoročne tehtnice, piknometra in primerjalne (tara) stekleničke z enako zunanjo prostornino, da se v katerem koli danem trenutku izloči učinek vzgona zraka. Ta preprosta tehnika se lahko uporabi z enoročno tehtnico pod pogojem, da se primerjalna (tara) steklenička ponovno stehta in se tako spremljajo spremembe vzgona zraka.

A.4 Postopek

Uvodne opombe:

Naslednji postopek opisuje uporabo 100-mililitrskega piknometra za določanje volumske vsebnosti alkohola; s tem se dosega največja točnost. Lahko se uporabi tudi manjši piknometer, na primer 50-mililitrski.

A.4.1 Umerjanje piknometra

Piknometer se umeri z določitvijo naslednjih osnovnih parametrov:

- masa praznega piknometra,
- prostornina piknometra pri 20 °C,
- masa z vodo napoljenega piknometra pri 20 °C.

▼ B

A.4.1.1 Umerjanje z uporabo enoročne tehtnice:

Določimo:

- maso čistega, suhega piknometra (P),
- maso z vodo napolnjenega piknometra pri t °C (P1),
- maso prazne primerjalne (tara) stekleničke (T0).

A.4.1.1.1 Stehtamo čisti, suhi piknometer (P).

A.4.1.1.2 Piknometer pazljivo napolnimo z destilirano vodo sobne temperature in vanj vstavimo termometer.

Piknometer skrbno obrišemo do suhega in ga vstavimo v toplotno izolirano oblogo. Obračamo oblogo, dokler termometer ne pokaže stalne temperature.

Poravnamo raven v piknometru z zgornjim robom stranske cevke. Skrbno odčitamo temperaturo t °C, in če je to potrebno, popravimo morebitno netočnost na temperaturni skali.

Z vodo napoljeni piknometer stehtamo (P1).

A.4.1.1.3 Stehtamo primerjalno (tara) stekleničko (T0).

A.4.1.1.4 Izračun

— Masa praznega piknometra = P – m

pri čemer je m masa zraka v piknometru.

$$m = 0,0012 (P1 - P)$$

Opomba 2: 0,0012 je gostota suhega zraka pri 20 °C pri tlaku 760 mm Hg

— Prostornina piknometra pri 20 °C:

$$V_{20^{\circ}\text{C}} = [P1 - (P - m)] \times F_{t,1}$$

pri čemer je Ft koeficient za temperaturo t °C po tabeli 1 v poglavju 1 z naslovom „Gostota in relativna gostota“ Priloge k Uredbi (EGS) št. 2676/90 (str. 10).

Prostornina V20 °C mora biti znana na 0,001 ml natančno.

— Masa vode v piknometru pri 20 °C:

$$M_{20^{\circ}\text{C}} = V_{20^{\circ}\text{C}} \times 0,998203$$

pri čemer je 0,998203 gostota vode pri 20 °C.

Opomba 3: Če je treba, se lahko uporabi vrednost gostote v zraku 0,99715, volumska vsebnost alkohola pa se izračuna glede na ustrezno gostoto v zraku po uradnih (britanskih) carinskih in trošarinskih tabelah.

A.4.1.2 Umerjanje z uporabo dvoročne tehtnice:

A.4.1.2.1 Postavimo primerjalno (tara) stekleničko na levo skodelico in čist suh piknometer s pokrovčkom na desno skodelico. Uravnesimo ju z dodajanjem p gramov uteži k piknometru.

▼ B

A.4.1.2.2 Piknometar pazljivo napolnimo z destilirano vodo sobne temperature in vstavimo termometer; piknometar skrbno obrišemo do suhega in vstavimo v toplotno izolirano oblogo; obračamo jo, dokler termometer ne pokaže stalne temperature.

Raven v piknometru natančno poravnamo z zgornjim robom stranske cevi. Očistimo stransko cev, naravnamo pokrovček, skrbno odčitamo temperaturo t °C in po potrebi popravimo vse netočnosti na temperaturni skali.

Stehtamo z vodo napolnjeni piknometar, tako da masa p' v gramih pomeni ravnotežje.

A.4.1.2.3 Izračun

— Masa praznega piknometra = p + m

pri čemer je m masa zraka v piknometru.

$$m = 0,0012 (p - p')$$

— Prostornina piknometra pri 20 °C:

$$V_{20\text{ °C}} = (p + m - p') \times F_t, 1$$

pri čemer je Ft faktor za temperaturo t °C po tabeli I iz poglavja 1 „Gostota in relativna gostota“ Priloge k Uredbi (EGS) št. 2676/90 (str. 10).

Prostornina V20 °C mora biti znana do 0,001 ml natančno.

— Masa vode v piknometru pri 20 °C:

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

pri čemer je 0,998203 gostota vode pri 20 °C.

A.4.2 Določanje volumske vsebnosti alkohola preskusnega vzorca

A.4.2.1 Z uporabo enoročne tehtnice.

A.4.2.1.1 Določimo maso T1 primerjalne (tara) stekleničke.

A.4.2.1.2 Stehtamo piknometar s pripravljenim destilatом (glej Dodatek I), P2 je njegova masa pri t °C.

A.4.2.1.3 Izračun

$$\text{— } dT = T1 - T0$$

— Masa praznega piknometra v trenutku merjenja

$$= P - m + dT$$

— Masa tekočine v piknometru pri t °C

$$= P2 - (P - m + dT)$$

— Gostota pri t °C v g/ml

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

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

— Gostoto pri t °C v kilogramih na m³ izrazimo tako, da $\rho_{t\text{ °C}}$ pomnožimo s 1 000, ta vrednost je znana kot ρ_t .

Popravimo ρ_t do 20 z uporabo tabele gostot ρ_T za vodno-alkoholne zmesi (tabela II Dodatek II k Priročniku analiznih metod OIV (1994), str. 17–29).

▼B

V tabeli poiščemo vodoravno vrsto, ki ustreza najbližji temperaturi T pod t °C v celih stopinjah in najmanjšo gostoto nad ρ_t . Razliko, ki jo najdemo pod to gostoto, uporabimo za izračun gostote ρ_t žganja pri temperaturi T v celih stopinjah.

- Z uporabo celotne temperaturne vrste izračunamo razliko med gostoto ρ' v tabeli takoj nad ρ_t in izračunano gostoto ρ_t . Dobljeno razliko delimo z razliko iz tabele, ki jo najdemo desno od gostote ρ' . Količnik pomeni decimalni delež volumske vsebnosti alkohola, medtem ko je s celimi števili izražena volumska vsebnost alkohola na vrhu stolpca za gostoto ρ' (D_t , alkoholna stopnja).

Opomba 4: Piknometar, ki ga napolnimo do oznake, naj bo v vodni kopeli s stalno temperaturo 20 °C ($\pm 0,2$ °C).

A.4.2.1.4 Rezultat

Za izračun dejanske volumske vsebnosti alkohola uporabimo gostoto ρ_{20} in si pri tem pomagamo s spodaj navedenimi tabelami za volumsko vsebnost alkohola:

Tabela, ki izraža vrednost volumske vsebnosti alkohola z volumnom (vol %) pri 20 °C kot funkcijo gostote vodno-alkoholnih zmesi pri 20 °C, je mednarodna tabela, ki jo je sprejela Mednarodna organizacija za zakonsko meroslovje v Priporočilu št. 22.

A.4.2.2 Metoda z uporabo enoročne tehtnice

A.4.2.2.1 Stehnamo piknometar s pripravljenim destilatoma (glej del I), p'' je masa pri temperaturi t °C.

A.4.2.2.2 Izračun

- Masa tekočine v piknometru pri t °C

$$= p + m - p''$$

- Gostota pri t °C v g/ml

$$\rho_{t^{\circ}\text{C}} = (p + m - p'') / V_{20^{\circ}\text{C}}$$

- Gostoto pri t °C izrazimo v kilogramih na m^3 in popravimo temperaturno skalo, da lahko izračunamo koncentracijo alkohola pri 20 °C, kakor je opisano zgoraj za uporabo enoročne tehtnice.

A.5 Učinkovitost metode (natančnost)

A.5.1 Statistični rezultati medlaboratorijskega preskusa

Naslednji podatki izvirajo iz mednarodne študije o učinkovitosti metode, ki je opravljena po mednarodno priznanih postopkih [1] [2].

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	20
Število vzorcev	6

▼ **B**

Vzorci	A	B	C	D	E	F
Število laboratorijev po izločitvi	19	20	17	19	19	17
Število izločenih (laboratorijev)	1	—	2	1	1	3
Število sprejetih rezultatov	38	40	34	38	38	34
Srednja vrednost (\bar{x}) v vol %	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51(*)			42,93(*)	45,73(*)	63,03(*)
Standardni odklik ponovljivosti (Sr) v vol %	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Relativni standardni odklik ponovljivosti (RSD _r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Meja ponovljivosti (r) v vol %	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Stand. odklik obnovljivosti (SR) v vol %	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Relativni standardni odklik obnovljivosti (RSDR) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Meja obnovljivosti (R) v vol %	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Vrste vzorcev

A Sadni liker; dvojna raven*.

B Vinjak; slepi vzorci.

C Viski; slepi vzorci.

D Grappa; dvojna raven*.

E Aquavit; dvojna raven*.

F Rum; dvojna raven*.

METODA B: DOLOČANJE DEJANSKE VOLUMSKE VSEBNOSTI ALKOHOLA V ŽGANIH PIJAČAH – ELEKTRONSKA DENZIMetriJA (NA PODLAGI REZONANČNEGA NIHANJA VZORCA V OSCILACIJSKI CELICI)

B.1 Princip

Gostota tekočine se določa z elektronskim merjenjem oscilacije resonančne U cevke. To je oscilacijski sistem, katerega frekvenca nihanja je odvisna od mase vzorca.

B.2 Reagenti in materiali

Če ni navedeno drugače, se med analizo uporabljajo samo reagenti priznane analizne kakovosti in voda vsaj kakovostne stopnje 3, kakor je to opredeljeno v ISO 3696:1987.

B.2.1 Aceton (CAS 666-52-4) ali absolutni alkohol.

B.2.2 Suhi zrak.

B.3 Aparatura in oprema

Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

B.3.1 Elektronski denzimeter z digitalnim prikazom

Za takšne meritve mora elektronski denzimeter omogočati prikaz gostote v g/ml na 5 decimalnih mest natančno.

▼B

Opomba 1: Denzimeter mora biti na popolnoma stabilnem stojalu, zaščitenem pred vsemi tresljaji.

B.3.2 Nastavitev temperature

Merjenje z elektronskim denzimetrom je veljavno le, če je merilna celica povezana z vgrajenim regulatorjem temperature, ki zadržuje temperaturo z odstopanji $\pm 0,02$ °C ali manj.

Opomba 2: Natančna nastavitev in spremljanje temperature v merilni celici sta zelo pomembna, kajti napaka 0,1 °C lahko privede do odstopanja gostote za kar 0,1 kg/m³.

B.3.3 Brizgalke ali avtomatski vzorčevalec.

B.4 **Postopek**

B.4.1 Umerjanje denzimetra

Aparaturo je treba ob prvi uporabi umeriti v skladu z navodili njenega izdelovalca. Umerjanje se redno ponavlja in preverja s certificiranim referenčnim standardom ali interno referenčno laboratorijsko raztopino, pripravljeno na podlagi certificiranega referenčnega standarda.

B.4.2 Določanje gostote vzorca

B.4.2.1 Če je treba, pred merjenjem celico očistimo in osušimo z acetonom ali absolutnim alkoholom in suhim zrakom. Celico splaknemo z vzorcem.

B.4.2.2 Vzorec vbrizgamo v celico (za to uporabimo brizgalko ali avtomatski vzorčevalec), tako da je celica v celoti polna. Med polnjenjem pazimo, da odstranimo prav vse zračne mehurčke. Vzorec mora biti homogen in ne sme vsebovati nobenih trdnih delcev. Vse suspendirane snovi je treba pred analizo odstraniti s filtriranjem.

B.4.2.3 Ko se izmerjena vrednost ustali, zabeležimo gostoto ρ_{20} ali koncentracijo alkohola, ki jo izpiše denzimeter.

B.4.3 Rezultat

Kadar se uporabi gostota ρ_{20} , izračunamo dejansko volumsko vsebnost alkohola iz tabel za volumsko vsebnost alkohola, ki so dane spodaj:

Tabela, ki daje volumsko vsebnost alkohola pri 20 °C (vol %) kot funkcijo gostote vodno-alkoholnih zmesi pri 20 °C, je mednarodna tabela, ki jo je prevzela tudi Mednarodna organizacija za zakonsko meroslovje v Priporočilu št. 22.

B.5 **Učinkovitost metode (natančnost)**

B.5.1 Statistični rezultati medlaboratorijskih preskusov

Naslednji podatki izvirajo iz mednarodne študije o učinkovitosti metode, ki je opravljena po mednarodno priznanih postopkih [1] [2].

Leto medlaboratorijskega preskusa 1997

Število laboratorijev 16

Število vzorcev 6

Vzorci	A	B	C	D	E	F
Število laboratorijev po izločitvi	11	13	15	16	14	13
Število izločenih (laboratorijev)	2	3	1	–	1	2

▼B

Vzorci	A	B	C	D	E	F
Število sprejetih rezultatov	22	26	30	32	28	26
Srednja vrednost (\bar{x}) v vol %	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52(*)			43,10(*)	45,91(*)	63,31(*)
Standard. odmik ponovljivosti (Sr) v vol %	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD _r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Meja ponovljivosti (r) v vol %	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v vol %	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Meja obnovljivosti (R) v vol %	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Vrste vzorcev

- A Sadni liker; dvojna raven*.
 B Vinjak; slepi vzorci.
 C Viski; slepi vzorci.
 D Grappa; dvojna raven*.
 E Aquavit; dvojna raven*.
 F Rum; dvojna raven*.

METODA C: DOLOČANJE DEJANSKE VOLUMSKE VSEBNOSTI ALKOHOLA V ŽGANIH PIJAČAH – MERJENJE Z UPORABO HIDROSTATSKE TEHTNICE

C.1 Princip

Volumsko vsebnost alkohola v žganih pijačah je mogoče določiti z merjenjem gostote destilata s hidrostatsko tehtnico na podlagi Arhimedovega načela, v skladu s katerim na telo, potopljeno v tekočino, ta tekočina deluje z navpično silo vzgona, ki je enaka teži izpodrinjene tekočine.

C.2 Reagenti in materiali

Če ni drugače navedeno, se za analizo uporabljajo samo reagenti priznane analizne kakovosti in voda kakovostne stopnje 3, kakor je to opredeljeno v ISO 3696:1987.

C.2.1 Raztopina za čiščenje plovca (natrijev hidroksid, 30 % w/v)

Za pripravo 100 ml odtehtamo 30 g natrijevega hidroksida in dopolnimo do 100 ml s 96 vol % etanolom.

C.3 Aparatura in oprema

Običajna laboratorijska aparatura in zlasti naslednje:

C.3.1 Enoročna hidrostatska tehtnica z občutljivostjo 1 mg.

C.3.2 Plovec s prostornino najmanj 20 ml, posebej prilagojen tehtnici, obešen na žico s premerom, manjšim od 0,1 mm.

C.3.3 Merilni valj z oznako ravni. Plovec mora biti potopljen v del valja, ki je pod oznako; površino tekočine lahko predira le nosilna žica. Notranji premer merilnega valja mora biti za vsaj 6 mm večji od premera plovca.

▼B

C.3.4 Termometer (ali sonda za merjenje temperature) z označenimi stopinjami, razdeljenimi na desetine, od 10 do 40 °C, in umerjen na 0,05 °C.

C.3.5 Uteži, ki jih je umeril priznan organ za certificiranje.

Opomba 1: Možna je tudi uporaba dvoročne tehtnice; princip je opisan v poglavju 1 „Gostota in relativna gostota“ Priloge k Uredbi (EGS) št. 2676/90 (str. 7).

C.4 **Postopek**

Plovec in merilni valj je treba pred vsakim merjenjem sprati z destilirano vodo, osušiti z mehkim laboratorijskim papirjem, ki ne pušča vlaken, in splakniti z raztopino, kateri se določa gostota. Merjenja je treba opraviti takoj, ko aparatura doseže stabilnost, da se tako omeji izguba alkohola zaradi izparevanja.

C.4.1 Umerjanje tehtnice

Čeprav imajo tehtnice navadno notranji sistem umerjanja, mora imeti hidrostatska tehtnica možnost umerjanja z utežmi, ki jih je preveril uradni organ za certificiranje.

C.4.2 Umerjanje plovca

C.4.2.1 Napolnimo merilni valj do oznake z dvakrat destilirano vodo (ali vodo enakovredne čistoče, npr. mikrofiltrirano vodo s prevodnostjo 18,2 MΩ/cm) pri temperaturi med 15 °C in 25 °C, toda najbolje pri 20 °C.

C.4.2.2 Potopimo plovec in termometer v vodo, premešamo, z aparata odčitamo gostoto tekočine, in če je treba, popravimo izmerjeno gostoto tako, da je enaka gostoti vode pri temperaturi merjenja.

C.4.3 Preverjanje z vodno-alkoholno raztopino

C.4.3.1 Merilni valj napolnimo do oznake z vodno-alkoholno raztopino z znano volumsko vsebnostjo alkohola, pri temperaturi med 15 °C in 20 °C, toda najbolje pri 20 °C.

C.4.3.2 Plovec in termometer potopimo v tekočino, premešamo, z aparature odčitamo gostoto tekočine (ali volumsko vsebnost alkohola, če aparatura to omogoča). Tako ugotovljena volumska vsebnost alkohola mora biti enaka poprej določeni.

Opomba 2: Ta raztopina z znano volumsko vsebnostjo alkohola se lahko uporabi namesto dvakrat destilirane vode za umerjanje plovca.

C.4.4 Merjenje gostote destilata (ali volumske vsebnosti alkohola, če aparatura to omogoča)

C.4.4.1 Preskusni vzorec nalijemo v merilni valj do oznake.

C.4.4.2 Vanj potopimo plovec in termometer, premešamo, z aparature odčitamo gostoto tekočine (ali volumsko vsebnost alkohola, če aparatura to omogoča). Če se gostota meri pri t °C (ρ_1), si zapišemo temperaturo.

C.4.4.3 Popravimo ρ_1 pri 20 z uporabo tabele gostot ρ_T za vodno-alkoholne zmesi (tabela II Priloge II k Priročniku analiznih metod OIV (1994), str. 17–29).

C.4.5 Spiranje plovca in merilnega valja

C.4.5.1 Potopimo plovec v raztopino za čiščenje plovca v merilnem valju.

▼ B

C.4.5.2 Pustimo, da se namaka eno uro, in plovec občasno zavrtimo.

C.4.5.3 Dobro splaknemo pod pipo in nazadnje še z destilirano vodo.

C.4.5.4 Osušimo z mehkim laboratorijskim papirjem, ki ne pušča vlaken.

Ta postopek opravimo ob prvi uporabi plovca in potem redno glede na uporabo.

C.4.6 Rezultat

Iz gostote p_{20} izračunamo dejansko volumsko vsebnost alkohola po spodaj navedenih tabelah za volumsko vsebnost alkohola.

Tabela, ki daje vrednost volumske vsebnosti alkohola (vol %) pri 20 °C kot funkcijo gostote pri 20 °C vodno-alkoholnih zmesi, je mednarodna tabela, ki jo je sprejela Mednarodna organizacija za zakonsko meroslovje v Priporočilu št. 22.

C.5 Učinkovitost metode (natančnost)

C.5.1 Statistični rezultati medlaboratorijskega preskusa

Naslednji podatki izvirajo iz mednarodne študije o učinkovitosti metode, ki je opravljena po mednarodno priznanih postopkih [1] [2].

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	12
Število vzorcev	6

Vzorci	A	B	C	D	E	F
Število laboratorijev po izločitvi	12	10	11	12	11	9
Število izločenih (laboratorijev)	–	2	1	–	1	2
Število sprejetih rezultatov	24	20	22	24	22	18
Srednja vrednost (\bar{x}) v vol %	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51(*)			43,09(*)	45,89(*)	63,44(*)
Standard. odmik ponovljivosti (Sr) v vol %	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD _r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Meja ponovljivosti (r) v vol %	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v vol %	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Meja obnovljivosti (R) v vol %	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Vrste vzorcev

A Sadni liker; dvojna raven*.

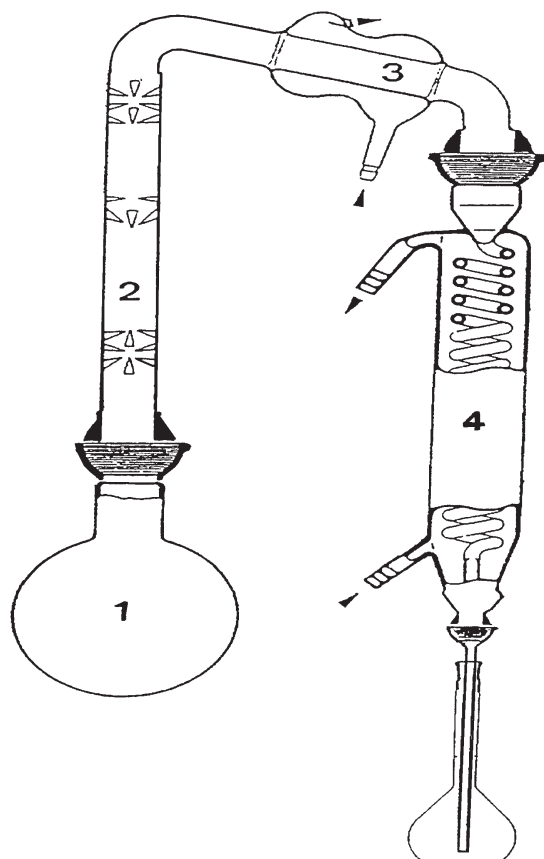
B Vinjak; slepi vzorci.

C Viski; slepi vzorci.

D Grappa; dvojna raven*.

E Aquavit; dvojna raven*.

F Rum; dvojna raven*.

▼B

Slika 1. Destilacijska aparatura za merjenje dejanske volumnske vsebnosti alkohola v žganih pijačah

1. 1-litrska bučka z okroglim dnom in standardiziranim sferičnim obrusom.
2. Vigreuxova destilacijska (rektifikacijska) kolona (20 cm).
3. Ravni Westov hladilnik (10 cm).
4. Vijačna hladilna cev (40 cm).

▼B**II. DOLOČANJE SKUPNEGA EKSTRAKTA ŽGANIH PIJAČ Z GRAVIMETRIJO****1. Področje uporabe**

Uredba (EGS) št. 1576/89 predvideva to metodo samo za aquavit, pri katerem suhi ekstrakt ne presega 15 g/l.

2. Normativne reference

ISO 3696:1987: Voda za laboratorijske analize – specifikacije in preskusne metode.

3. Opredelitev

Skupni suhi ekstrakt ali skupna suha snov obsega vso snov, ki v določenih fizikalnih pogojih ni hlapna.

4. Princip

Tehtanje ostanka po izparevanju alkohola nad vrelo vodno kopeljo in po sušenju v sušilniku.

5. Aparatura in oprema

5.1 Valjasta izparilna posoda z ravnim dnom in premerom 55 mm.

5.2 Vrela vodna kopel.

5.3 25-mililitrska pipeta, razreda A.

5.4 Sušilnik.

5.5 Eksikator.

5.6 Analitska tehtnica s točnostjo 0,1 mg.

6. Vzorčenje in vzorci

Vzorci se pred analizo hranijo pri sobni temperaturi.

7. Postopek

7.1 Odpipetiramo 25 ml žganja z manj kakor 15 g/l suhe snovi v poprej stehtano valjasto izparilno posodo z ravnim dnom in premerom 55 mm. Prvo uro izparevanja je izparilna posoda na pokrovu vrele vodne kopeli, tako da tekočina ne vre, saj bi to lahko povzročilo izgube zaradi škropljenja. Posodo pustimo še eno uro v neposrednem stiku s paro vrele vodne kopeli.

7.2 Sušenje končamo tako, da postavimo izparilno posodo za dve uri v sušilnik, segret na $105\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Pustimo posodo v eksikatorju, da se ohladi, potem pa jo skupaj z vsebino stehtamo.

8. Izračun

Masa ostanka, pomnožena s 40, je enaka suhemu ekstraktu, vsebovanemu v žganju, izražena pa mora biti v g/l na eno decimalno mesto natančno.

9. Učinkovitost metode (natančnost)

9.1 Statistični rezultati medlaboratorijskega preskusa

Naslednji podatki izvirajo iz mednarodne študije o učinkovitosti metode, ki je opravljena po mednarodno priznanih postopkih [1] [2].

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	10
Število vzorcev	4

▼B

Vzorci	A	B	C	D
Število laboratorijev po izločitvi	9	9	8	9
Število izločenih (laboratorijev)	1	1	2	–
Število sprejetih rezultatov	18	18	16	18
Srednja vrednost (\bar{x}) v g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Meja ponovljivosti (r) v g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Stand. odmik primerljivosti (SR) v g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Rel. stand. odmik primerljivosti (RSD _R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Meja obnovljivosti (R) v g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
 B Rum; dvojna raven.
 C Grappa; dvojna raven.
 D Aquavit; dvojna raven.



III. DOLOČANJE Hlapnih SNOVI IN METANOLA V ŽGANIH PIJAČAH

III.1 SPLOŠNE OPOMBE

1. **Opredelitve**

Uredba (EGS) št. 1576/89 predpisuje minimalne vsebnosti hlapnih sestavin, razen etanola in metanola, za vrsto žganih pijač (rum, žganja iz grozdja, sadna žganja itd.) Po dogovoru se le za vsebnosti v teh pijačah upošteva, da so enake vsoti koncentracij:

1. hlapnih kislin, izraženih kot očetna kislina;
2. aldehydov, izraženih kot etanal z vsoto etanala (acetaldehida) in frakcije etanala v 1,1-dietoksietanu (acetal);
3. naslednjih višjih alkoholov: propan-1-ola, butan-1-ola, butan-2-ola, 2-metilpropan-1-ola, določenih kot posamezni alkoholi, ter 2-metilbutan-1-ola in 3-metilbutan-1-ola, določenih posamezno ali kot vsota obeh;
4. etilacetata.

Naslednje metode so standardne za merjenje hlapnih spojin:

- hlapne kisline z določanjem hlapne kislosti,
- aldehidi (etanal in acetal), etilacetat in alkoholi s plinsko kromatografijo (*GPC*).

2. **Analiza hlapnih spojin s plinsko kromatografijo**

Analiziranje hlapnih spojin, razen zgoraj navedenih, s plinsko kromatografijo se lahko izkaže za posebej zanimivo kot sredstvo ugotavljanja izvora surovine, uporabljene pri destilaciji, pa tudi dejanskih pogojev destilacije.

Nekatera žganja vsebujejo še druge hlapne sestavine, na primer aromatične spojine, značilne za surovine, iz katerih se pridobiva alkohol, za aromo žganih pijač in za posebnosti priprave žganja. Te spojine so pomembne za ocenjevanje zahtev, določenih v Uredbi (EGS) št. 1576/89.

III.2 DOLOČANJE Hlapnih SNOVI S PLINSKO KROMATOGRFIJO: ALDEHIDOV, VIŠJIH ALKOHOLOV, ETILACETATA IN METANOLA

1. **Področje uporabe**

Ta metoda je primerna za določanje 1,1 dietoksietana (acetal), 2-metilbutan-1-ola (aktivni amilni alkohol) 3-metilbutan-1-ola (izoamilni alkohol), metanola (metilni alkohol), etiletanoata (etilacetat), butan-1-ola (n-butanol), butan-2-ola (sekundarni butanol), 2-metilpropan-1-ola (izobutilni alkohol), propan -1-ola (n-propanol) in etanala (acetaldehid) v žganih pijačah z uporabo plinske kromatografije. Metoda uporablja interni standard, na primer pentan-3-ol. Koncentracije analiziranih snovi so izražene v gramih na 100 litrov absolutnega alkohola; vsebnost alkohola v izdelku pa je treba določiti pred analizo. Žgane pijače, ki jih je mogoče analizirati s to metodo, so viski, vinjak, rum, vinsko žganje, sadno žganje in žganje iz grozdnih tropin.

2. **Normativne reference**

ISO 3696:1987: Voda za uporabo pri laboratorijskih analizah – specifikacije in preskusne metode.

▼ B**3. Opredelitev**

Hlapne snovi nastajajo skupaj z etanolom med vrenjem, destiliranjem in zorenjem žganih pijač.

4. Princip

Hlapne snovi v žganih pijačah se določajo z neposrednim injiciranjem žgane pijače ali primerno razredčene žgane pijače v sistem plinske kromatografije (GC). Pred injiciranjem se žgani pijači doda primeren interni standard. Hlapne snovi se ločujejo s programiranjem temperature na primerni koloni, odkrivajo pa se z detektorjem FID. Koncentracija vsake hlapne snovi se določa glede na interni standard iz faktorjev odziva, ki jih dobimo med umerjanjem pri istih kromatografskih nastavitvah kakor za analizo žgane pijače.

5. Reagenti in materiali

Če ni drugače navedeno, uporabljamo samo reagente s čistočo nad 97 %, nabavljene pri dobaviteljih s certifikatom *ISO*, s certifikatom o čistoči, brez drugih hlapnih snovi pri testnem redčenju (to se lahko potrdi z injiciranjem posameznih standardov pri testnem redčenju in nastavitvah plinske kromatografije kakor pri točki 6.4), in le vodo najmanj kakovostne stopnje 3, kakor je to opredeljeno v *ISO* 3696. Acetal in acetaldehid morata biti shranjena v temi pri < 5 °C, vsi drugi reagenti pa se lahko hranijo pri sobni temperaturi.

5.1 Absolutni etanol (CAS 64-17-5).

5.2 Metanol (CAS 67-56-1).

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

5.4 ► **C1** 2-metilpropan-1-ol (CAS 78-83-1). ◀

5.5 Sprejemljivi interni standardi: pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-metilpentan-1-ol (CAS 626-89-1) ali metilnonanoat (CAS 1731-84-6).

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

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

5.8 Etilacetat (CAS 141-78-6).

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

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

5.11 Acetaldehid (CAS 75-07-0).

5.12 Acetal (CAS 105-57-7).

5.13 Raztopina etanola 40 % v/v

Za pripravo 400 ml/l raztopine etanola nalijemo 400 ml etanola (5.1) v 1-litrsko merilno bučko, dopolnimo do oznake z destilirano vodo in premešamo.

▼ M3

5.13a Samo za etanol kmetijskega porekla, absolutni etanol (CAS 64-17-5).

▼ B

- 5.14 Priprava in hranjenje standardnih raztopin (postopek, ki se uporablja za validirano metodo).

Vse standardne raztopine moramo hraniti pri $< 5\text{ °C}$ in vsak mesec sveže pripraviti. Mase sestavin in raztopin zapišemo na 0,1 mg natančno.

- 5.14.1 Standardna raztopina – A

V 100-mililitrsko merilno bučko, ki zaradi hlapnosti reagentov že vsebuje približno 60 ml raztopine etanola (5.13), odpipetiramo spodaj našete reagente, dopolnimo do oznake z raztopino etanola (5.13) in dobro premešamo. Zapišemo maso bučke, vsake dodane sestavine in skupno končno maso vsebine.

Sestavina	Prostornina (ml)
Metanol (5.2)	3,0
Propan-1-ol (5.3)	3,0
2-metilpropan-1-ol (5.4)	3,0
2-metilbutan-1-ol (5.6)	3,0
3-metilbutan-1-ol (5.7)	3,0
Etilacetat (5.8)	3,0
Butan-1-ol (5.9)	3,0
Butan-2-ol (5.10)	3,0
Acetaldehid (5.11)	3,0
Acetal (5.12)	3,0

Opomba 1: Acetal in acetaldehid je bolje dodati nazadnje, da so izgube zaradi izhlapevanja čim manjše.

▼ M3

- 5.14.1a Samo za etanol kmetijskega porekla se pripravi standardna raztopina A za pipetiranje reagentov z zmanjšanimi volumenskimi količinami višjih alkoholov, da se pridobijo standardne raztopine s koncentracijami, ki so blizu zakonskim mejnim vrednostim za etanol kmetijskega porekla.

▼ B

- 5.14.2 Standardna raztopina – B

Odpipetiramo 3 ml pentan-3-ola ali drugega primernege internega standarda (5.5) v 100-mililitrsko merilno bučko, v kateri je približno 80 ml raztopine etanola (5.13), dopolnimo do oznake z raztopino etanola (5.13) in dobro premešamo.

Zapišemo maso bučke, maso pentan-3-ola ali drugega dodanega internega standarda, potem pa še skupno končno maso.

▼ M3

- 5.14.2a Samo za etanol kmetijskega porekla se pripravi standardna raztopina B za pipetiranje primernege internega standarda z zmanjšanimi volumenskimi količinami, da se pridobijo standardne raztopine s koncentracijami, ki so blizu zakonskim mejnim vrednostim za etanol kmetijskega porekla.

▼B

5.14.3 Standardna raztopina – C

Odpipetiramo 1 ml raztopine A (5.14.1) in 1 ml raztopine B (5.14.2) v 100-mililitrsko merilno bučko, v kateri je približno 80 ml raztopine etanola (5.13), dopolnimo do oznake z raztopino etanola (5.13) in dobro premešamo.

Zapišemo maso bučke, vsake dodane sestavine, potem pa še skupno končno maso.

5.14.4 Standardna raztopina – D

Da bi ohranili ponovljivost analiz, pripravimo standard za kontrolo kakovosti in zanj uporabimo že pripravljeni standard A (5.14.1). 1 ml raztopine A (5.14.1) odpipetiramo v 100-mililitrsko merilno bučko, v kateri je približno 80 ml raztopine etanola (5.13), dopolnimo do oznake z raztopino etanola (5.13) in dobro premešamo.

Zapišemo maso bučke, vsake dodane sestavine, potem pa še skupno končno maso.

5.14.5 Standardna raztopina – E

Odpipetiramo 10 ml raztopine B (5.14.2) v 100-mililitrsko merilno bučko, v kateri je približno 80 ml raztopine etanola (5.13), dopolnimo do oznake z raztopino etanola (5.13) in dobro premešamo.

Zapišemo maso bučke, vsake dodane sestavine, potem pa še skupno končno maso.

5.14.6 Standardne raztopine, s katerimi se preverja linearnost odziva detektorja *FID*

V ločene 100-mililitrske merilne bučke, v katerih je približno 80 ml raztopine etanola (5.13), odpipetiramo 0, 0,1, 0,5, 1,0 in 2,0 ml raztopine A (5.14.1) in 1 ml raztopine B (5.14.2), dopolnimo do oznake z raztopino etanola (5.13) in dobro premešamo.

Zapišemo maso bučke, vsake dodane sestavine, potem pa še skupno končno maso.

5.14.7 Standardna raztopina QC

Odpipetiramo 9 ml standardne raztopine D (5.14.4) in 1 ml standardne raztopine E (5.14.5) v posodo za tehtanje in dobro premešamo.

Zapišemo maso bučke, vse dodane sestavine, potem pa še skupno končno maso.

▼ B**6. Aparatura in oprema**

- 6.1 Aparatura, s katero je mogoče meriti gostoto in vsebnost alkohola.
- 6.2 Analitska tehnica, s katero je mogoče meriti na štiri decimalna mesta natančno.
- 6.3 Plinski kromatograf z nastavljivo temperaturo, opremljen z detektorjem FID in integratorjem ali drugim sistemom za obdelavo podatkov, ki lahko meri območje ali višino vrha.
- 6.4 Kolona(-e) plinskega kromatografa, ki lahko loči(-jo) analizirane snovi, tako da je najmanjša ločljivost med posameznimi sestavinami (razen 2-metilbutan-1-ola in 3-metilbutan-1-ola) vsaj 1,3.

Opomba 2: Ustrezni primeri so naslednje kolone in nastavitve plinske kromatografije:

1. Predkolona 1 m 0,32 mm i.d., povezana s kolono CP-VAX 57 CB 50 m 0,32 mm i.d. z debelino nanosa 0,2 µm (stabilizirani polietilenglikol), ki ji sledi kolona *Carbowax* 400 50 m 0,32 mm i.d. z debelino nanosa 0,2 µm. (Koloni sta povezani s spojko na stik.)

Nosilni plin in tlak: Helij (135 kPa)

Temperatura kolone: 17 minut 35 °C, od 35 do 70 °C po 12 °C na minuto, 25 minut zadržimo pri 70 °C

Temperatura injektorja: 150 °C

Temperatura detektorja: 250 °C

Injicirana prostornina: 1 µl, v razmerju 20 do 100:1

2. Predkolona 1 m 0,32 mm i.d., povezana s kolono CP-VAX 57 CB 50 m 0,32 mm i.d. z debelino nanosa 0,2 µm (stabilizirani polietilenglikol). (Koloni sta povezani s spojko na stik.)

Nosilni plin in tlak: Helij (65 kPa)

Temperatura kolone: 10 minut 35 °C, od 35 do 110 °C po 5 °C na minuto, od 110 do 190 °C po 30 °C na minuto, 2 minuti zadržimo pri 190 °C

Temperatura injektorja: 260 °C

Temperatura detektorja: 300 °C

Injicirana prostornina: 1 µl, v razmerju 55:1

▼ B

3. Polnjena kolona (5 % *CW* 20 M, *Carbopak B*), 2 m
2 mm i.d.

Temperatura kolone: 4 minute 65 °C, od 65 do
140 °C po 10 °C na minuto,
5 minut zadržimo pri 140 °C,
od 140 do 150 °C po 5 °C na
minuto, 3 minute zadržimo
pri 150 °C

Temperatura injektorja: 65 °C

Temperatura detektor-
ja: 200 °C

Injicirana prostornina: 1 µl

7. **Vzorčenje in vzorci**

7.1 Laboratorijski vzorec

Ob sprejetju se vsakemu vzorcu izmeri vsebnost alkohola (6.1).

8. **Postopek (ki se uporablja za validirano metodo)**

8.1 Odmerek vzorca

8.1.1 Stehtamo primerno zaprto posodo za tehtanje in maso zapišemo.

8.1.2 Odpipetiramo 9 ml laboratorijskega vzorca v posodo in zapišemo maso (M_{VZOREC}).

8.1.3 Dodamo 1 ml standardne raztopine E (5.14.5) in zapišemo maso (M_{IS}).

8.1.4 Preskusno snov temeljito pretresemo (vsaj 20 zasukov). Vzorce je treba pred analizo hraniti pri manj kakor 5 °C, da zmanjšamo izgube zaradi hlapnosti komponent.

8.2 Slepi preskus

8.2.1 S tehtnico z natančnostjo štirih decimalnih mest (6.2) stehtamo ustrezno zaprto posodo za tehtanje in maso zapišemo.

8.2.2 Odpipetiramo 9 ml raztopine etanola 400 ml/l (5.13) v posodo in zapišemo maso.

8.2.3 Dodamo 1 ml standardne raztopine E (5.14.5) in zapišemo maso.

8.2.4 Temeljito premešamo preskusni material (vsaj 20 zasukov). Vzorce je treba pred analizo hraniti pri manj kakor 5 °C, da zmanjšamo izgube zaradi hlapnosti komponent.

8.3 Poprejšnji preskus

Injiciramo standardno raztopino C (5.14.3), da preverimo, ali imajo vse analizirane snovi ločljivost vsaj 1,3 (razen 2-metilbutan-1-ola in 3-metilbutan-1-ola).

8.4 Umerjanje

Umerjanje se izvede po naslednjem postopku. Linearnost odziva zagotovimo tako, da zaporedoma opravimo trojno analizo vsake od standardnih raztopin za preverjanje linearnosti (5.14.6), ki vsebujejo interni standard (IS). Iz območij ali višin vrha v integratorju je treba za vsako injiciranje izračunati razmerje R vsake hlapne snovi in grafično predstaviti R glede na razmerje koncentracij hlapnih snovi in internega

▼ B

standarda (IS). Rezultat naj bi bil grafični prikaz s korelacijskim koeficientom najmanj 0,99.

$$R = \frac{\text{območje ali višina hlapne snovi}}{\text{območje ali vrha IS}}$$

$$C = \frac{\text{koncentracija hlapne snovi } (\mu\text{g/g})}{\text{koncentracija IS } (\mu\text{g/g})}$$

8.5 Določanje

Injiciramo standardno raztopino C (5.14.3) in 2 odmerka standardne raztopine QC za kontrolo kakovosti (5.14.7). Nadaljujemo z neznanimi vzorci (pripravljenimi v skladu z 8.1 in 8.2) in vključimo po en QC standard na vsakih 10 vzorcev, da zagotovimo ponovljivost analiz. Injiciramo odmerek standardne raztopine C (5.14.3) na vsakih 5 vzorcev.

9. Izračun

Uporabimo lahko avtomatizirani sistem obdelave podatkov, če je podatke mogoče preveriti po načelih, opisanih v spodnji metodi.

Izmerimo območje ali višino vrhov za hlapno snov in vrhove internega standarda.

9.1 Izračun faktorja odziva.

Faktorje odziva za vsako hlapno snov izračunamo iz kromatograma injicirane standardne raztopine C (5.14.3) z uporabo enačbe (1).

$$(1) \text{ faktor odziva} = \frac{\text{območje ali vrha IS}}{\text{območje ali vrha hlapne snovi}} \times \frac{\text{konc. hlapne snovi } (\mu\text{g/g})}{\text{konc. IS } (\mu\text{g/g})}$$

pri čemer je:

IS = interni standard

konc. hlapne snovi = koncentracija hlapne snovi v raztopini C (5.14.3)

konc. IS = koncentracija internega standarda v raztopini C (5.14.3).

9.1.2 Analiza vzorca

Z uporabo spodnje enačbe (2) izračunamo koncentracijo vsake od hlapnih snovi v vzorcih.

(2) koncentracije hlapnih snovi ($\mu\text{g/g}$) =

$$(2) \text{ koncentracije hlapnih snovi } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{območje ali vrha hlapne snovi}}{\text{območje ali vrha IS}} \times \frac{M_{\text{IS}} (\text{g})}{M_{\text{VZOREC}} (\text{g})} \times \text{konc. IS } (\mu\text{g/g}) \times \text{RF}$$

pri čemer je:

M_{VZOREC} = masa vzorca (8.1.2);

M_{IS} = masa internega standarda (8.1.3);

konc. IS = koncentracija notranjega standarda v raztopini E (5.14.5);

RF = faktor odziva, izračunan z enačbo 1.

▼ B

9.1.3 Analiza standardne raztopine za kontrolo kakovosti

Za vsako hlapno snov v standardih kontrole kakovosti (5.14.7) s spodnjo enačbo izračunamo doseženi delež ciljne koncentracije:

$$(3) \% \text{ doseženega QC vzorca} = \frac{\text{koncentracija analizirane snovi v QC standardu}}{\text{koncentracija analizirane snovi v raztopini D}} \times 100$$

Koncentracija analizirane snovi v QC standardu se izračuna z enačbama (1) in (2) zgoraj.

9.2 Končna predstavitev rezultatov

Rezultati vzorcev se pretvorijo iz μg v g na 100 litrov absolutnega alkohola z enačbo (4):

(4) koncentracija v g na 100 l absolutnega alkohola =

konc. ($\mu\text{g/g}$) ρ 10/(volumska vsebnost (vol %) \times 1 000)

pri čemer je ρ = gostota v kg/m^3 .

Rezultati se dajejo s trimestnimi števili in največ enim decimalnim mestom, npr. 11,4 g na 100 litrov čistega alkohola.

10. **Zagotavljanje kakovosti in kontrola (za validirano metodo)**

Z gornjo enačbo (2) izračunamo koncentracijo vsake hlapne snovi v standardnih raztopinah za kontrolo kakovosti, pripravljenih po postopku, opisanem od 8.1.1 do 8.1.4. Z enačbo (3) izračunamo doseženi delež ciljne koncentracije. Če so analizni rezultati za vsako hlapno snov znotraj $\pm 10\%$ svojih teoretičnih vrednosti, lahko nadaljujemo analizo. Če to niso, je treba poiskati vzrok netočnosti in narediti ustrezne popravke.

11. **Učinkovitost metode (natančnost)**

Statistični rezultati medlaboratorijskih preskusov: naslednje tabele dajejo vrednosti za naslednje spojine: etanal, etilacetat, acetal, skupni etanal, metanol, butan-2-ol, propan-1-ol, butan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-butan-1-ol, 3-metil-butan-1-ol.

Naslednji podatki so pridobljeni iz mednarodne študije o učinkovitosti metode, ki je opravljena po mednarodno priznanih postopkih.

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	32
Število vzorcev	5
Analizirana snov	Etanal

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	28	26	27	27	28
Število izločenih (laboratorijev)	2	4	3	3	2

▼ B

Vzorci	A	B	C	D	E
Število sprejetih rezultatov	56	52	54	54	56
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8(*)	28,6 52,2(*)
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Rel. stand. odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v $\mu\text{g/g}$	12	14	22	6,8	8,9
Rel. stand. odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Meja obnovljivosti (R) v $\mu\text{g/g}$	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
 B Kirsch; slepi vzorci.
 C Grappa; slepi vzorci.
 D Viski; dvojna raven*.
 E Rum; dvojna raven*.

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	32
Število vzorcev	5
Analizirana snov	Etilacetat

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	24	24	25	24	24
Število izločenih (laboratorijev)	2	2	1	2	2
Število sprejetih rezultatov	48	48	50	48	48
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8(*)	99,1 117,0(*)
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Rel. stand. odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v $\mu\text{g/g}$	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Rel. stand. odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Meja obnovljivosti (R) v $\mu\text{g/g}$	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
 B Kirsch; slepi vzorci.
 C Grappa; slepi vzorci.
 D Viski; dvojna raven*.
 E Rum; dvojna raven*.

▼B

Leto medlaboratorijskega preskusa 1997
 Število laboratorijev 32
 Število vzorcev 5
 Analizirana snov Acetal

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	20	21	22	17	21
Število izločenih (laboratorijev)	4	3	2	4	3
Število sprejetih rezultatov	40	42	44	34	42
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	35,04	36,46	68,5	20,36	15,1
				6,60(*)	28,3(*)
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Rel. stand. odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v $\mu\text{g/g}$	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Rel. stand. odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Meja obnovljivosti (R) v $\mu\text{g/g}$	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
 B Kirsch; slepi vzorci.
 C Grappa; slepi vzorci.
 D Viski; dvojna reven*.
 E Rum; dvojna reven*.

Leto medlaboratorijskega preskusa 1997
 Število laboratorijev 32
 Število vzorcev 5
 Analizirana snov Skupni etanal

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	23	19	22	21	22
Število izločenih (laboratorijev)	1	5	2	3	2
Število sprejetih rezultatov	46	38	44	42	44
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	76,5	85,3	156,5	45,4	32,7
				15,8(*)	61,8(*)
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Rel. stand. odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0

▼B

Vzorci	A	B	C	D	E
Stand. odkmik obnovljivosti (SR) v µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Rel. stand. odkmik obnovljivosti (RSDR) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Meja obnovljivosti (R) v µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Vrste vzorcev

A Vinjak; slepi vzorci.

B Kirsch; slepi vzorci.

C Grappa; slepi vzorci.

D Viski; dvojna reven*.

E Rum; dvojna reven*.

Leto medlaboratorijskega preskusa 1997

Število laboratorijev 32

Število vzorcev 5

Analizirana snov Metanol

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	26	27	27	28	25
Število izločenih (laboratorijev)	4	3	3	1	4
Število sprejetih rezultatov	52	54	54	56	50
Srednja vrednost (\bar{x}) v µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0	18,6
				61,5(*)	28,9(*)
Standardni odkmik ponovljivosti (Sr) v µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Rel. stand. odkmik ponovljivosti (RSDr) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Meja ponovljivosti (r) v µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Stand. odkmik obnovljivosti (SR) v µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Rel. stand. odkmik obnovljivosti (RSDR) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Meja obnovljivosti (R) v µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Vrste vzorcev

A Vinjak; slepi vzorci.

B Kirsch; slepi vzorci.

C Grappa; slepi vzorci.

D Viski; dvojna reven*.

E Rum; dvojna reven*.

Leto medlaboratorijskega preskusa 1997

Število laboratorijev 32

Število vzorcev 5

Analizirana snov Metanol

▼ B

Vzorci	A	B	C	E
Število laboratorijev po izločitvi	21	27	29	22
Število izločenih (laboratorijev)	4	3	1	3
Število sprejetih rezultatov	42	54	58	44
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	5,88	250,2	27,57	5,83
				14,12(*)
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	0,40	2,2	0,87	0,64
Rel. stand. odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	1,1	6,1	2,5	1,8
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v $\mu\text{g/g}$	0,89	13	3,2	0,87
Rel. stand. odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Meja obnovljivosti (R) v $\mu\text{g/g}$	2,5	35,5	8,9	2,4

Vrste vzorcev

A Vinjak; slepi vzorci.

B Kirsch; slepi vzorci.

C Grappa; slepi vzorci.

E Rum; dvojna raven*.

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	32
Število vzorcev	5
Analizirana snov	Propan-1-ol

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	29	27	27	29	29
Število izločenih (laboratorijev)	2	4	3	2	2
Število sprejetih rezultatov	58	54	54	58	58
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	86,4	3 541	159,1	272,1	177,1
				229,3(*)	222,1(*)
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Rel. stand. odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v $\mu\text{g/g}$	5,3	150	6,5	9,0	8,1

▼ B

Vzorci	A	B	C	D	E
Rel. stand. odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Meja obnovljivosti (R) v µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
 B Kirsch; slepi vzorci.
 C Grappa; slepi vzorci.
 D Viski; dvojna reven*.
 E Rum; dvojna reven*.

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	32
Število vzorcev	5
Analizirana snov	Propan – 1-ol

Vzorci	A	B	C
Število laboratorijev po izločitvi	20	22	22
Število izločenih (laboratorijev)	4	4	6
Število sprejetih rezultatov	40	44	44
Srednja vrednost (\bar{x}) v µg/g	3,79	5,57	7,54
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v µg/g	0,43	0,20	0,43
Rel. stand. odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	11,2	3,6	5,6
Meja ponovljivosti (r) v µg/g	1,1	0,6	1,2
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v µg/g	0,59	0,55	0,82
Rel. stand. odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	15,7	9,8	10,8
Meja obnovljivosti (R) v µg/g	1,7	1,5	2,3

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
 B Kirsch; slepi vzorci.
 C Grappa; slepi vzorci.

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	32
Število vzorcev	5
Analizirana snov	2-metilpropan-1-ol

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	28	31	30	26	25
Število izločenih (laboratorijev)	3	0	1	5	6
Število sprejetih rezultatov	56	62	60	52	50

▼ B

Vzorci	A	B	C	D	E
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8(*)	133,87(*)
Standardni odklik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Rel. stand. odklik ponovljivosti (RSDr) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Stand. odklik obnovljivosti (SR) v $\mu\text{g/g}$	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Rel. stand. odklik obnovljivosti (RSDR) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Meja obnovljivosti (R) v $\mu\text{g/g}$	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
 B Kirsch; slepi vzorci.
 C Grappa; slepi vzorci.
 D Viski; dvojna reven*.
 E Rum; dvojna reven*.

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	32
Število vzorcev	5
Analizirana snov	2-metil-butan-1-ol

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	25	26	25	27	25
Število izločenih (laboratorijev)	3	2	3	1	2
Število sprejetih rezultatov	50	52	50	54	50
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	113,0	48,3	91,6	72,1	39,5
				45,2(*)	61,5(*)
Standardni odklik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Rel. stand. odklik ponovljivosti (RSDr) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Stand. odklik obnovljivosti (SR) v $\mu\text{g/g}$	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Rel. stand. odklik obnovljivosti (RSDR) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Meja obnovljivosti (R) v $\mu\text{g/g}$	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
 B Kirsch; slepi vzorci.
 C Grappa; slepi vzorci.
 D Viski; dvojna reven*.
 E Rum; dvojna reven*.

▼ B

Leto medlaboratorijskega preskusa	1997
Število laboratorijev	32
Število vzorcev	5
Analizirana snov	3-metil-butan-1-ol

Vzorci	A	B	C	D	E
Število laboratorijev po izločitvi	23	23	24	27	21
Število izločenih (laboratorijev)	5	5	4	1	6
Število sprejetih rezultatov	46	46	48	54	42
Srednja vrednost (\bar{x}) v $\mu\text{g/g}$	459,4	242,7	288,4	142,2	212,3
				120,4(*)	245,6(*)
Standardni odmik ponovljivosti (Sr) v $\mu\text{g/g}$	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Rel. stand. odmik ponovljivosti (RSDr) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Meja ponovljivosti (r) v $\mu\text{g/g}$	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Stand. odmik obnovljivosti (SR) v $\mu\text{g/g}$	29,8	13	21	8,5	6,7
Rel. stand. odmik obnovljivosti (RSDR) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Meja obnovljivosti (R) v $\mu\text{g/g}$	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Vrste vzorcev

- A Vinjak; slepi vzorci.
- B Kirsch; slepi vzorci.
- C Grappa; slepi vzorci.
- D Viski; dvojna reven*.
- E Rum; dvojna reven*.

▼ M2

III.3 DOLOČANJE Hlapne kislosti žganih pijač

1. **Področje uporabe**

Metoda je bila validirana v medlaboratorijski študiji za rum, vinjak, žganje iz tropin in sadno žganje v območju od 30 mg/l do 641 mg/l.

2. **Normativne reference**

ISO 3696: 1987 Voda za analitično uporabo – specifikacije in preskusne metode.

3. **Opredelitve**

- 3.1 Hlapna kislost se izračuna tako, da nehlapne kisline odštejemo od skupnih kislin.
- 3.2 Skupne kisline so vsota titrabilnih kislin.
- 3.3 Nehlapne kisline so kisline v ostanku, potem ko pustimo žganje izpareti do suhega.

4. **Princip**

Skupne in nehlapne kisline se določijo s titracijo ali s potenciometrijo.

5. **Reagenti in materiali**

Če ni drugače navedeno, se za analizo uporabljajo samo reagenti priznane analizne kakovosti in voda kakovostne stopnje vsaj 3, kakor je opredeljena v ISO 3696:1987.

▼ M2

- 5.1 0,01 M raztopina natrijevega hidroksida (NaOH).
- 5.2 Raztopina mešanih indikatorjev
- Odtetamo 0,1 g indigo karmina in 0,1 g fenola rdeče.
- Raztopimo v 40 ml vode in dopolnimo do 100 ml z etanolom.
6. **Aparatura in oprema**
- Laboratorijska aparatura za posredno analizo, steklovina razreda A in:
- 6.1 Vodna črpalka
- 6.2 Rotavapor ali ultrazvočna kopel
- 6.3 Oprema za potenciometrično titracijo (neobvezno)
7. **Vzorčenje in vzorci**
- Vzorci se pred analizo hranijo na sobni temperaturi.
8. **Postopek**
- 8.1 Skupne kisline
- 8.1.1 Priprava vzorca
- Žganje obsevamo z ultrazvokom (ultrasonifikacija) ali dve minuti mešamo v vakuumu, da se po potrebi izloči ogljikov dioksid.
- 8.1.2 Titracija
- Odpipetiramo 25 ml žganja v 500-mililitersko erlenmajerico.
- Dodamo približno 200 ml ohlajene zavrete destilirane vode (dnevno sveže pripravljene) in 2–6 kapljic raztopine mešanih indikatorjev (5.2).
- Titriramo z 0,01 M raztopino natrijevega hidroksida (5.1), dokler se rumeno-zelena barva ne spremeni v vijolično pri brezbarvnih žganjih oziroma rumenorjava barva v rdečerjavo pri rjavo obarvanih žganjih.
- Titracija se lahko izvede tudi s potenciometrijo (do 7,5 pH).
- Z n_1 ml označimo prostornino dodane 0,01 M raztopine natrijevega hidroksida.
- 8.1.3 Izračun
- Skupne kisline (TA), izražene v miliekvivalentih na liter žganja, so enake $0,4 \times n_1$.
- Skupne kisline (TA), izražene v miligramih oetne kisline na liter žganja, so enake $24 \times n_1$.
- 8.2 Nehlapne kisline
- 8.2.1 Priprava vzorca
- 25 ml žganja pustimo izpareti do suhega:
- Odpipetiramo 25 ml žganja v valjasto izparilno posodo z ravnim dnem in premerom 55 mm. Prvo uro izparevanja je izparilna posoda na pokrovu vrele vodne kopeli, tako da tekočina ne vre, saj bi to lahko povzročilo izgube zaradi škropljenja.
- Sušenje končamo tako, da postavimo izparilno posodo za dve uri v sušilnik, segret na 105 °C. Izparilno posodo pustimo v eksikatorju, da se ohladi.
- 8.2.2 Titracija
- Ostarek, dobljen po izparevanju, raztopimo v ohlajeni zavreti destilirani vodi (dnevno sveže pripravljene) do približno 100 ml in dodamo 2–6 kapljic raztopine mešanih indikatorjev (5.2).

▼ **M2**

Titriramo z 0,01 M raztopino natrijevega hidroksida (5.1)

Titracija se lahko izvede tudi s potenciometrijo (do 7,5 pH).

Z n_2 ml označimo prostornino dodane 0,01 M raztopine natrijevega hidroksida.

8.2.3 Izračun

Nehlapne kisline (FA), izražene v miliekvivalentih na liter žganja, so enake $0,4 \times n_2$.

Nehlapne kisline (FA), izražene v miligramih očetne kisline na liter žganja, so enake $24 \times n_2$.

9. **Izračun hlapne kislosti**

9.1 Izražanje v miliekvivalentih na liter:

Naj bo:

TA = skupne kisline v miliekvivalentih na liter

FA = nehlapne kisline v miliekvivalentih na liter

Hlapna kislost (VA) v miliekvivalentih na liter je:

$$TA - FA$$

9.2 Izražanje v miligramih očetne kisline na liter:

Naj bo:

TA' = skupne kisline v miligramih očetne kisline na liter

FA' = nehlapne kisline v miligramih očetne kisline na liter

Hlapna kislost (VA) v miligramih očetne kisline na liter je:

$$TA' - FA'$$

9.3 Izražanje v gramih očetne kisline na hektoliter čistega 100 vol. % alkohola

$$\text{je: } \frac{TA' - FA'}{A} \times 10$$

kjer je A volumska vsebnost alkohola žgane pijače.

10. **Učinkovitost metode (natančnost)**

10.1 Statistični rezultati medlaboratorijskega preskusa

Naslednji podatki izvirajo iz mednarodne študije o učinkovitosti metode, opravljene po mednarodno priznanih postopkih [1] [2].

Leto medlaboratorijskega preskusa 2000

Število laboratorijev 18

Število vzorcev 6

Vzorci	A	B	C	D	E	F
Število laboratorijev po izločitvi	16	18	18	14	18	18
Število izločenih (laboratorijev)	2			4		
Število sprejetih rezultatov	32	36	36	28	36	36
Srednja vrednost (\bar{x}) [mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5

▼ **M2**

Vzorci	A	B	C	D	E	F
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD _r) [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Meja ponovljivosti (r) [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Standardni odmik obnovljivosti (s _R) [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD _R) [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Meja obnovljivosti (R) [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Vrste vzorcev:

A Slivovo žganje; dvojna koncentracija*

D Rum I; slepi vzorci

C Rum II; dvojna koncentracija*

D Slivovka; slepi vzorci

E Vinjak; slepi vzorci

F Žganje iz tropin; slepi vzorci

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

[2] Horwitz, W. (1982) „Analytical Chemistry 54, 67A-76A“.

▼ M1**V. ANETOL. DOLOČITEV TRANS-ANETOLA V ŽGANIH PIJAČAH S PLINSKO KROMATOGRAFIJO****1. Področje uporabe**

Ta metoda je ob uporabi plinske kromatografije primerna za določitev trans-anetola v žganih pijačah z janežem.

2. Normativne reference

ISO 3696: 1987 Voda za analitično laboratorijsko uporabo – specifikacija in testne metode.

3. Načelo

Vsebnost trans-anetola v žganju določimo s plinsko kromatografijo (GC). Enako količino internega standarda (npr.: 4-alinasola (estragola), kadar estragol ni naravno prisoten v vzorcu) dodamo testnemu vzorcu in referenčni raztopini znane koncentracije in oba raztopimo v 45-odstotni raztopini etanola ter neposredno vbrizgnemo v sistem GC. Pred pripravo vzorca in analizo likerjev, ki vsebujejo velike količine sladkorja, je potrebna ekstrakcija.

4. Reagenti in materiali

Za analizo uporabljamo samo reagente s čistostjo vsaj 98 %. Uporabimo vodo vsaj 3. razreda, kakor je opredeljena v standardu ISO 3696.

Referenčne kemikalije je treba hraniti v hladnem (pri 4 °C) in temnem prostoru v aluminijastih posodah ali v pobarvanih (rumenkastorjavih) steklenicah za reagente. Zamaške je po možnosti treba opremiti z aluminijasto folijo. Trans-anetol je treba pred uporabo „odtaliti“ iz njegovega kristaliziranega stanja, vendar v tem primeru njegova temperatura ne bi smela nikoli presežati 35 °C.

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

4.2 1-metoksi-4-(1-propenil) benzol; (trans-anetol) (CAS 4180-23-8)

4.3 4-alilanisole, (estragol) (CAS 140-67-0), priporočeni interni standard (IS)

4.4 Etanol, 45 vol %.

Dodamo 560 g destilirane vode 378 gramom etanola 96 vol %.

4.5 Priprava standardnih raztopin

Vse standardne raztopine je treba hraniti v temnem prostoru pri sobni temperaturi (15 do 35 °C) v aluminijastih posodah ali v pobarvanih (rumenkastorjavih) steklenicah za reagente. Zamaške je treba po možnosti opremiti z aluminijasto folijo.

Trans-anetol in 4-alilanol sta praktično netopljiva v vodi, zato je treba trans-anetol in 4-alilanol raztopiti v delu 96-odstotnega etanola (4.1), preden dodamo 45-odstotni etanol (4.4).

Osnovne raztopine je treba na novo pripraviti tedensko.

4.5.1 Standardna raztopina A

Osnovne raztopine trans-anetola (koncentracija: 2 g/l)

Stehtamo 40 mg trans-anetola (4.2) v 20-mililitrsko merilno bučko (ali 400-mg v 200- mililitrsko, itn.). Dodamo nekaj 96-odstotnega etanola (4.1) in dopolnimo s 45-odstotnim etanolom (4.4) ter temeljito premešamo.

▼ M1

4.5.2 Interni standard B

Osnovna raztopina internega standarda, npr. estragola (koncentracija: 2 g/l)

Stehtamo 40 mg estragola (4.3) v 20-mililitrsko merilno bučko (ali 400-mg v 200- mililitrsko, itn.). Dodamo nekaj 96-odstotnega etanola (4.1) in dopolnimo s 45-odstotnim etanolom (4.4) ter temeljito premešamo.

4.5.3 Raztopine, ki se uporabljajo za preverjanje linearnosti odziva plamensko-ionizacijskega detektorja (FID)

Linearni odziv FID-a se mora preverjati pri analizi, upoštevajoč razpon koncentracij trans-anetola v žganju od 0 g/l do 2,5 g/l. V postopku analize se neznani vzorci žganja 10-krat razredčijo (8.3). Da bi ustvarili analizne pogoje, opisane v metodi, se osnovne raztopine koncentracij 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, in 0,25 g/l trans-anetola pripravijo tako: vzamemo 0,5, 1, 1,5, 2, in 2,5 ml osnovne raztopine A (4.5.1) in jih odpipetiramo v ločene 20-mililitrske merilne bučke; v vsako merilno bučko dodamo 2 ml interne standardne raztopine B (4.5.2) in dopolnimo s 45-odstotnim etanolom (4.4) ter temeljito premešamo.

Kot slepa proba (8.4) se uporablja raztopina koncentracije 0 g/l. (8.4).

4.5.4 Standardna raztopina C

2 ml standardne raztopine A (4.5.1) odpipetiramo v ločeno 20-mililitrsko merilno bučko, dodamo 2 ml internega standarda B (4.5.2) ter dopolnimo s 45-odstotnim etanolom (4.4) ter temeljito premešamo.

5. Aparature in oprema

5.1 Plinska kromatografija, opremljena s plamensko-ionizacijskim detektorjem (FID) in integratorjem ali drugim sistemom za obdelavo podatkov, ki lahko meri višine ali površine pikov, ter avtomatskim vzorčevalcem ali potrebno opremo za ročno vbrizgavanje vzorcev.

5.2 Injektor tipa split/splitless

5.3 Kapilarna kolona, npr.:

Dolžina: 50 m

Notranji premer: 0,32 mm

Debelina prevleke: 0,2 µm

Stacionarna faza: FFAP – modificiran TPA zamrežen polietilen glikol.

5.4 Laboratorijska oprema: Steklene merilne posode razreda A, analitska tehtnica (natančnost: ± 0,1 mg).

6. Kromatografski pogoji

Tip in dimenzije kolone ter pogoji delovanja plinske kromatografije morajo biti taki, da sta anetol in interni standard ločena eden od drugega ter od drugih motečih snovi. Tipične razmere za kolono, ki je dana kot primer v 5.3, so:

▼ M1

- 6.1 Nosilni plin: analitski helij
- 6.2 Pretok: 2 ml/min
- 6.3 Temperatura injektorja: 250 °C
- 6.4 Temperatura detektorja: 250 °C
- 6.5 Temperaturne razmere pečice: izotermne, 180 °C, čas delovanja 10 minut
- 6.6 Prostornina vbrizga: 1 µl, split 1:40.

7. Vzorci

Vzorce hranimo pri sobni temperaturi v hladnem in temnem prostoru.

8. Postopek**8.1 Preverjanje prisotnosti estragola**

Za potrditev odsotnosti estragola v vzorcu je treba opraviti slepo analizo brez dodatka internega standarda. Če je estragol naravno prisoten, moramo uporabiti drug interni standard (na primer mentol).

Odipetiramo 2 ml vzorca v 20-mililitrsko bučko in dopolnimo s 45-odstotnim etanolom (4.4) ter temeljito premešamo.

8.2 Priprava neznanih vzorcev

Odipetiramo 2 ml vzorca v 20-mililitrsko merilno bučko, nato dodamo 2 ml internega standarda B (4.5.2) in dopolnimo s 45-odstotnim etanolom (4.4) ter temeljito premešamo.

8.3 Slepí poskus

Odipetiramo 2 ml internega standarda B (4.5.2) v 20-mililitrsko merilno bučko in jo dopolnimo s 45-odstotnim etanolom (4.4) ter temeljito premešamo.

8.4 Test linearnosti

Pred začetkom analize je treba preveriti linearnost odziva FID z zaporedno trikratno analizo linearnosti standardnih raztopin (4.5.3).

Na podlagi največjih površin ali višin integratorja izdelamo za vsak vbrizg graf koncentracije izvornih raztopin v g/l proti razmerju R za vsako raztopino.

$R = \text{površina ali višina trans-anetola, deljena s površino ali višino estragola.}$

Dobiti moramo linearno odvisnost.

8.5 Določitev

Vbrizgamo slepi poskus (8.3), nato standardno raztopino C (4.5.4), nato enega od standardov linearnosti (4.5.3), ki delujejo kot kontrolni vzorec kakovosti (tega lahko izberemo s sklicevanjem na verjetno koncentracijo trans-etanola v neznanem vzorcu), nato pet neznanih vzorcev (8.2). Standardni vzorec (kontrolni vzorec) vbrizgamo po petih neznanih vzorcih, da zagotovimo analitično stabilnost.

▼ M1**9. Izračun faktorja odzivnosti**

Merimo bodisi površino pika (z uporabo integratorja ali drugega podatkovnega sistema) bodisi višino (ročna integracija) trans-anetola in internega standarda.

9.1 Izračun faktorja odzivnosti (RF_i)

Faktor odzivnosti se izračuna:

$$RF_i = (C_i/\text{površina ali višina}_i) * (\text{površina ali višina}_{is}/C_{is}),$$

pri čemer je:

C_i koncentracija trans-anetola v standardni raztopini A (4.5.1)

C_{is} koncentracija internega standarda v standardni raztopini B (4.5.2)

površina_i površina (ali višina) trans-anetola

površina_{is} površina (ali višina) internega standarda

RF_i se izračuna na podlagi petih vzorcev raztopine C (4.5.4).

9.2 Analiza linearnosti odziva testnih vzorcev

Vbrizgamo testne vzorce linearnosti odziva (4.5.3).

9.3 Analiza vzorca

Vbrizgamo neznane vzorce (8.2).

10. Izračun rezultatov

Formula za izračun koncentracije trans-anetola je:

$$c_i = C_{is} * (\text{površina ali višina}_i/\text{površina ali višina}_{is}) * RF_i,$$

pri čemer je:

c_i neznana koncentracija trans-anetola

C_{is} koncentracija internega standarda v neznani raztopini (4.5.2)

$\text{površina ali višina}_i$ površina (ali višina) trans-anetola

$\text{površina ali višina}_{is}$ površina (ali višina) internega standarda

RF_i odzivnost koeficienta (izračunanega kakor v 9.1)

Koncentracija trans-anetola se izraža v gramih na liter, zaokroženih na eno decimalno mesto.

11. Zagotovitev kakovosti in nadzora

Kromatogrami morajo biti taki, da sta anetol in interni standard ločena drug od drugega ter od katere koli moteče snovi. Vrednost RF_i se izračuna na podlagi rezultatov petih vbrizgov raztopine C (4.5.4). Če je koeficient variacije ($CV \% = (\text{standardni odmik/srednja vrednost}) * 100$) v intervalu plus ali minus 1 %, je srednja vrednost RF_i sprejemljiva.

▼ M1

Zgornji izračun uporabimo za koncentracijo trans-*anetola* v vzorcu, izbranem za nadzor kakovosti na podlagi linearnosti kontrolnih raztopin (4.5.3).

Če je srednja vrednost rezultatov izračunana na podlagi vzorcev linearnosti, izbrana za interni kontrolni vzorec kakovosti (IQC), v intervalu plus ali minus 2,5 % od teoretične vrednosti, so rezultati za neznan vzorec sprejemljivi.

12. **Ravnanje z vzorci žganih pijač z veliko vsebnostjo sladkorja in vzorci likerjev pred analizo s plinsko kromatografijo**

Ekstrakcija alkohola iz žgane pijače z veliko vsebnostjo sladkorja, zato da bi se omogočila določitev koncentracije trans-*anetola*, uporabljajoč plinsko kromatografijo (GC).

12.1 Načelo

Vzamemo alikvot vzorca likerja in mu dodamo interni standard v podobni koncentraciji kakor analitu (*trans-anetola*) v likerju. Nato dodamo natrijev fosfat dodekahidrat in brezvodni amonijev sulfat. Mešanico dobro pretresemo in ohladimo, razvijeta se dve plasti, nato odstranimo zgornjo plast alkohola. Vzamemo alikvot te plasti alkohola in razredčimo s 45-odstotno raztopino etanola (4.4) (Opomba: v tej fazi se ne dodaja noben interni standard, ker je že dodan). Pridobljeno raztopino analiziramo s plinsko kromatografijo.

12.2 Reagenti in materiali

Med ekstrakcijo uporabimo samo reagente čistosti 99 % in več.

12.2.1 Amonijev sulfat, brezvodni (CAS 7783-20-2).

12.2.2 Natrijev fosfat dodekahidrat, dvobazni (CAS 10039-32-4).

12.3 Aparature in oprema

Erlenmajerice, liji ločniki, hladilnik.

12.4 Postopek

12.4.1 Preverjanje prisotnosti estragola

Za preverjanje odsotnosti estragola \checkmark v vzorcu, je treba izvesti slepo ekstrakcijo (12.6.2) in analizo brez dodajanja internega standarda. Če je estragol naravno prisoten, uporabimo drug interni standard.

12.4.2 Ekstrakcija

Od Pipetiramo 5 ml 96-odstotnega etanola (4.1) v erlenmajerico in vanjo stehamo 50 mg internega standarda (4.3) ter dodamo 50 ml vzorca. Dodamo 12 g brezvodnega amonijevega sulfata (12.2.1) in 8,6 g dvobaznega natrijevega fosfatadodekahidrata (12.2.2). Zamašimo erlenmajerico.

Erlenmajerico stresamo vsaj 30 minut. Lahko uporabimo mehanski stresalnik, vendar ne magnetnega mešala, prevlečenega s teflonom, ker bi teflon absorbiral nekaj analita. Upoštevamo, da se dodane soli ne bodo raztopile v celoti.

Zamašeno erlenmajerico damo v hladilnik ($T < 5\text{ C}$) za vsaj dve uri.

▼ M1

Medtem se morajo ustvariti dve ločeni plasti in trdni ostanek. Plast alkohola mora biti čista, če ni, damo erlenmajerico ponovno v hladilnik, dokler ne dosežemo jasne ločitve.

Ko je plast alkohola čista, previdno odvzamemo alikvot (npr. 10 ml) brez dotikanja vodne plasti, damo v temno stekleničko in trdno zapremo.

12.4.3 Priprava ekstrahiranega vzorca

Pustimo, da ekstrakt (12.4.2) doseže sobno temperaturo.

Vzamemo 2 ml alkoholne plasti vzorca pri sobni temperaturi in ga odpi-petiramo v 20-mililitrsko merilno bučko, dopolnimo s 45-odstotnim etanolom (4.4) in temeljito premešamo.

12.5 Določitev

Sledimo postopku, kakor je opisan v 8.5.

12.6 Izračun rezultatov

Uporabimo naslednjo formulo za izračun rezultatov:

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

pri čemer je:

m_{is} masa internega standarda (4.3), ki je uporabljen (12.4.2) (v miligramih),

V prostornina neznanega vzorca (50 ml)

RF_i faktor odzivnosti (9.1)

površina_i površina trans-anetola

površina_{is} površina internega standarda

Rezultate izrazimo v gramih na liter, zaokroženih na eno decimalno mesto.

12.7 Nadzor in zagotovitev kakovosti

Sledimo postopku, kakor je opisan v 11 zgoraj.

13. **Značilnosti rezultatov metode (natančnost)**

Statistični rezultati medlaboratorijskega poskusa:

naslednje tabele vsebujejo vrednosti za anetol.

Naslednji podatki so pridobljeni na podlagi mednarodnega medlaborato-rijskega preskusa, ki je opravljen v skladu z mednarodno priznanimi postopki.

Leto medlaboratorijskega poskusa	1998
Število laboratorijev	16
Število vzorcev	10
Analit	anetol

▼ **M1**

Pastis:

Vzorci	A	B	C	D	E	F
Število preostalih laboratorijev po izločitvi	15	15	15	13	16	16
Število izločenih (laboratorijev)	1	1	1	3	—	—
Število sprejetih rezultatov	30	30	30	26	16	16
Srednja vrednost g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Standardni odklon ponovljivosti (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Relativni standardni odklon ponovljivosti (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Meja ponovljivosti (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Standardni odklon obnovljivosti (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Relativni standardni odklon obnovljivosti (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Meja obnovljivosti (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Vrste vzorcev:

- A pastis, slepi, duplikati
- B pastis, slepi, duplikati
- C pastis, slepi, duplikati
- D pastis, slepi, duplikati
- E pastis, posamezni, duplikati
- F pastis, posamezni, duplikati

Druge žgane pijače z janežem:

Vzorci	G	H	I	J
Število preostalih laboratorijev po izločitvi	16	14	14	14
Število izločenih (laboratorijev)	—	2	1	1
Število sprejetih rezultatov	32	28	28	28
Srednja vrednost g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Standardni odklon ponovljivosti (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Relativni standardni odklon ponovljivosti (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Meja ponovljivosti (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Standardni odklon obnovljivosti (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Relativni standardni odklon obnovljivosti (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Meja obnovljivosti (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Vrste vzorcev:

- G ouzo, split (*)
- H jane, slepi duplikati
- I liker z janežem, duplikati
- J liker z janežem, duplikati

▼ **M1****VI. GLICIRIZINSKA KISLINA. DOLOČITEV GLICIRIZINSKE KISLINE Z UPORABO TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI****1. Področje uporabe**

Ta metoda je primerna za določitev glicirizinske kisline v žganih pijačah z janežem z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Uredba (EGS) št. 1576/89 določa, da mora žgana pijača „pastis“ vsebovati med 0,05 in 0,5 g glicirizinske kisline na liter.

2. Normativne reference

ISO 3696: 1987 Voda za analitično laboratorijsko uporabo – specifikacija in testne metode.

3. Načelo

Koncentracijo glicirizinske kisline določimo z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) z UV-detektorjem. Standardno raztopino in testni vzorec filtriramo in ju ločeno vbrizgamo neposredno v sistem tekočinske kromatografije.

4. Reagenti in materiali

Za analizo uporabljamo le reagente, ki ustrezajo zahtevam tekočinske kromatografije, absolutni etanol in vodo 3. razreda, kakor je definirana s standardom ISO 3696.

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

4.2 Amonijev glicirizinat, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (amonijevega sol glicirizinske kisline)

(Mol. Wt.: 839,98)(CAS 53956-04-0): vsaj 90-odstotna čistost

(Mol. Wt.: glicirizinska kislina 822,94).

4.3 Ocetna kislina (ledocet), CH_3COOH , (CAS 64-19-7).

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

4.5 Etanol, 50 vol %.

Za 1 000 ml pri 20 °C:

— etanol, 96 vol. % (4.1): 521 ml

— voda (2.0): 511 ml.

4.6 Priprava elucijskih raztopin za visoko učinkovito tekoče izpiranje

4.6.1 Mobilna faza (topilo) A (primer)

80 delov (prostornina) vode (2.0)

20 delov (prostornina) očetne kisline (4.3).

Razplinjujemo topilo pet minut.

Opomba: Če uporabljena voda ni mikrofiltrirana, je priporočljivo filtrirati pripravljeno topilo skozi filter za organska topila z velikostjo lukenj 0,45 μm ali manj.

4.6.2 Mobilna faza (topilo) B (primer)

Metanol (4.4).

4.7 Priprava standardnih raztopin

Vse standardne raztopine moramo sveže pripraviti po dveh mesecih.

4.7.1 Referenčna raztopina C

Z natančnostjo na 0,1 mg stehamo 25 mg amonijevega glicirizinata (4.2) v 100-mililitrsko merilno bučko. Dodamo nekaj 50 -odstotnega etanola (4.5) in raztopimo amonijev glicirizinat. Ko se raztopi, dopolnimo do oznake s 50-odstotnim etanolom. (4.5).

▼ M1

Filtriramo skozi filter za organska topila.

4.7.2 Standardne raztopine, ki se uporabljajo za preverjanje linearnosti odziva instrumentov

Osnovno raztopino 1,0 g/l pripravimo s tehtanjem, z natančnostjo na 0,1 mg. 100 mg amonijevega glicirizinata stehtamo v 100-mililitrsko merilno bučko. Dodamo nekaj 50-odstotnega etanola (4.5) in raztopimo amonijev glicirizinat. Ko se raztopi, dopolnimo do oznake s 50 –odstotnim etanolom (4.5).

Pripravimo vsaj štiri druge raztopine, ki ustrezajo koncentracijam amonijevega glicirizinata 0,05, 0,1, 0,25 in 0,5 g/l, s posamičnim pipetiranjem 5 ml, 10 ml, 25 ml in 50 ml osnovne raztopine s koncentracijo 1,0 g/l v ločene 100-mililitrske merilne bučke. Nato do oznake dopolnimo s 50-odstotnim etanolom (4.5) in temeljito premešamo.

Filtriramo vse raztopine skozi filter za organska topila.

5. **Aparature in oprema**

5.1 Separacijski sistem

5.1.1 Tekoča kromatografija visoke ločljivosti

5.1.2 Črpalni sistem, ki nam omogoča doseganje in ohranjanje stalnega programiranega pretoka z veliko natančnostjo.

5.1.3 UV-spektrofotometrični detekcijski sistem: nastavimo na 254 nm.

5.1.4 Sistem za razplinjanje topil.

5.2 Računalniški integrator ali registrator združljiv z drugim sistemom.

5.3 Kolona (primer):

Material: nerjaveče jeklo ali steklo

Notranji premer: 4 do 5 mm

Dolžina: 100 do 250 mm

Stacionarna faza: silika, opláščena z oktadecilno skupino (C18), velikost delca: 5 µm.

5.4 Laboratorijska oprema

5.4.1 Analitska tehtnica z natančnostjo 0,1 mg

5.4.2 Merilna posoda razreda A

5.4.3 Priprave za filtriranje za mikromembransko filtracijo majhnih prostornin

6. **Kromatografski pogoji**

6.1 Elucijske značilnosti: (primer)

— pretok: 1 ml/minuto,

— topilo A = 30 %,

— topilo B = 70 %,

6.2 Detekcija:

— UV = 254 nm

7. **Postopek**

7.1 Priprava vzorca žgane pijače

Po potrebi filtriramo skozi filter za organska topila (premer lukenj: 0,45 µm).

▼ **M1**

7.2 Določitev

Ko se ustalijo kromatografski pogoji,

— vbrizgamo 20 µl referenčne raztopine C (4.7.1),

— vbrizgamo 20 µl vzorčne raztopine,

— primerjamo oba kromatograma. Identificiramo pike glicirizinske kisline na podlagi njihovega retenzijskega časa. Izmerimo njihove površine (ali višine) in izračunamo koncentracijo v g/l, zaokroženo na dve decimalni mesti natančno, z naslednjo enačbo:

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

pri čemer je:

c koncentracija v gramih na liter glicirizinske kisline v žgani pijači, ki jo analiziramo

C koncentracija v gramih na liter amonijevega glicirizinata v referenčni raztopini

h površina (ali višina) glicirizinske kisline v žgani pijači, ki jo analiziramo

H površina (ali višina) glicirizinske kisline v referenčni raztopini

P čistost referencnega amonijevega glicirizinata (v %)

823 masa enega mola glicirizinske kisline

840 masa enega mola amonijevega glicirizinata.

8. **Značilnosti rezultatov metode (natančnost)**

Statistični rezultati medlaboratorijskega preskusa:

naslednja tabela vsebuje vrednosti glicirizinske kisline.

Naslednji podatki so pridobljeni na podlagi mednarodnega medlaboratorijskega poskusa, opravljenega v skladu z mednarodno priznanimi postopki.

Leto medlaboratorijskega poskusa	1998
Število laboratorijev	16
Število vzorcev	5
Analit	glicirizinska kislina

Vzorci	A	B	C	D	E
Število preostalih laboratorijev po izločitvi	13	14	15	16	16
Število izločenih (laboratorijev)	3	2	1	—	—
Število sprejetih rezultatov	26	28	30	32	32
Srednja vrednost g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Standardni odklon ponovljivosti (S _r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Relativni standardni odklon ponovljivosti (RSD _r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Meja ponovljivosti (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Standardni odklon obnovljivosti(S _R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013

▼ M1

Vzorci	A	B	C	D	E
Relativni standardni odklon obnovljivosti (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Meja obnovljivosti (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Vrste vzorcev:

- A pastis, slepi, duplikati
- B pastis, split (*)
- C pastis, slepi, duplikati
- D pastis, slepi, duplikati
- E pastis, slepi, duplikati

▼ M1**VII. HALKONI. METODA TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE
VISOKE LOČLJIVOSTI ZA PREVERJANJE PRISOTNOSTI
HALKONOV V PASTISU****1. Področje uporabe**

Ta metoda je primerna za določitev prisotnosti halkonov v pijačah z janežem. Halkoni so naravna barvila iz družine flavonoidov, ki jih najdemo v koreninah sladkega golostebelnega korena (*Glycyrrhiza glabra*).

Žgana pijača z imenom „pastis“ mora vsebovati halkone (Uredba (EGS) št. 1576/89).

2. Normativne reference

ISO 3696: 1987 Voda za analitsko laboratorijsko uporabo – specifikacija in testne metode.

3. Načelo

Pripravimo referenčno raztopino ekstraktov iz sladkega golostebelnega korena. Prisotnost ali odsotnost halkonov določimo z uporabo tekoče kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) z UV-detektorjem.

4. Reagenti in materiali

Za analizo uporabimo le reagente, ki ustrezajo zahtevam tekočinske kromatografije. Etanol mora biti vsaj 96-odstoten. Uporablja se voda 3. razreda, kakor je definirana v standardu ISO 3696.

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

4.2 Acetonitril, CH₃CN, (CAS 75-05-8)

4.3 Referenčna snov: *Glycyrrhiza glabra*: sladki golostebelni koren

Grobo zmlate korenine sladkega golostebelnega korena (*Glycyrrhiza glabra*). Povprečne dimenzije delcev: dolžina: 10 do 15 mm, debelina: 1 do 3 mm.

4.4 Natrijev acetat, CH₃COONa, (CAS 127-09-3)

4.5 Ocetna kislina (ledocet), CH₃COOH, (CAS 64-19-7)

4.6 Priprava raztopin

4.6.1 Etanol, 50 vol %

Za 1 000 ml pri 20 °C:

— etanol, 96 vol. % (4.1): 521 ml,

— voda (2.0): 511 ml.

4.6.2 Topilo A: acetonitril

Acetonitril (4.2) z analitično čistostjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti.

Razplinimo.

4.6.3 Topilo B: 0,1 M pufer raztopina natrijevega acetata, pH 4,66.

V merilno bučko stehamo 8,203 g natrijevega acetata (4.4), dodamo 6,005 g očetne kisline (ledocet) (4.5) in z vodo dopolnimo do 1 000 ml (2).

5. Priprava referenčnih ekstraktov iz *Glycyrrhiza glabra* (4.3)

5.1 Stehamo 10 g zmlatih korenin sladkega golostebelnega korena (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) in damo v destilacijsko bučko z okroglim dnom

— dodamo 100 ml etanola z vsebnostjo 50 vol. % (4.6.1),

— vremo eno uro ob povratnem toku (refluksu),

— filtriramo,

— shranimo filtrat za kasnejšo uporabo.

▼ M1

- 5.2 Vzamemo ekstrakt korena iz filtra
- damo v destilacijsko bučko z okroglim dnom
 - dodamo 100 ml 50-odstotnega etanola, (4.6.1),
 - vremo eno uro ob povratnem toku (refluksu),
 - filtriramo. Shranimo filtrat za kasnejšo uporabo.
- 5.3 Ekstrakcija korenine sladkega golostebelnega korena se opravi trikrat zaporedoma.
- 5.4 Združimo vse tri filtrate.
- 5.5 Pustimo, da topilna faza (iz 5.4) izhlapi na rotacijskem evaporatorju.
- 5.6 Preostali ekstrakt (iz 5.5) dopolnimo s 100 ml 50-odstotnega etanola. (4.6.1).
- 6. Aparature in oprema**
- 6.1 Separacijski sistem.
- 6.1.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- 6.1.2 Črpalni sistem, ki lahko doseže in ohrani stalno ali programirano hitrost pretoka pri visokem pritisku.
- 6.1.3 UV/vidni spektrofotometrični detektor, ki se lahko nastavi na 254 in 370 nm.
- 6.1.4 Sistem za razplinjanje topil:
- 6.1.5 Termostat kolone, ki se lahko nastavi na temperaturo $40 \pm 0,1$ °C.
- 6.2 Računalniški integrator ali registrator združljiv z drugim separacijskim sistemom.
- 6.3 Kolona
- Material: nerjaveče jeklo ali steklo
- Notranji premer: 4 do 5 mm
- Stacionarna faza: silika, oplaščena z oktadecilno skupino (C 18), velikost delca: 5 µm.
- 6.4 Običajna laboratorijska oprema:
- 6.4.1 analitska tehtnica (natančnost: $\pm 0,1$ mg)
- 6.4.2 destilacijska aparaturna s kondenzatorjem povratnega toka (refluksa), vključujoč npr.:
- 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom s standardiziranim brusom iz brušenega stekla,
 - 30 cm dolgi kondenzator povratnega toka in
 - vir toplote (z uporabo ustrezne priprave moramo preprečiti vsako pirogeno reakcijo nepredestilirane snovi).
- 6.4.3 Rotacijski evaporator.
- 6.4.4 Filtracijski sistem (tj. Buchnerjevega lija).
- 6.5 Kromatografski pogoji (primer).
- 6.5.1 Elucijske značilnosti topil A (4.6.2) in B (4.6.3):
- gradient iz 20/80 (v/v) na 50/50 (v/v) v 15 minutah,
 - gradient iz 50/50 (v/v) na 75/25 (v/v) v petih minutah,
 - izenačimo 75/25 (v/v) za pet minut,

▼ **M1**

- stabilizacija kolone med vbrizgi,
- izenačimo 20/80 (v/v) za pet minut,

6.5.2 Pretok: 1 ml/minuto.

6.5.3 Nastavitve UV-detektorja:

Detektor mora biti nastavljen na 370 nm za detekcijo halkonov in potem na 254 nm za detekcijo glicirizinske kisline.

Opomba: sprememba valovne dolžine (z 370 nm na 254 nm) mora biti opravljena 30 sekund prej, preden elucija glicirizinske kisline začne dosegati največje vrednosti.

7. Postopek

7.1 Priprava vzorca žgane pijače

Filtriramo skozi filter za organska topila (premer lukenj: 0,45 µm).

7.2 Priprava ekstrakta iz sladkega golostebelnega korena (5.6)

Naredimo raztopino ena proti deset s 50-odstotnim etanolom (4.6.1)

7.3 Določitev

7.3.1 Vbrizgamo 20 µl pripravljenega ekstrakta (7.2). Analizo izvedemo pri kromatografskih pogojih, ki so opisani zgoraj (6.5).

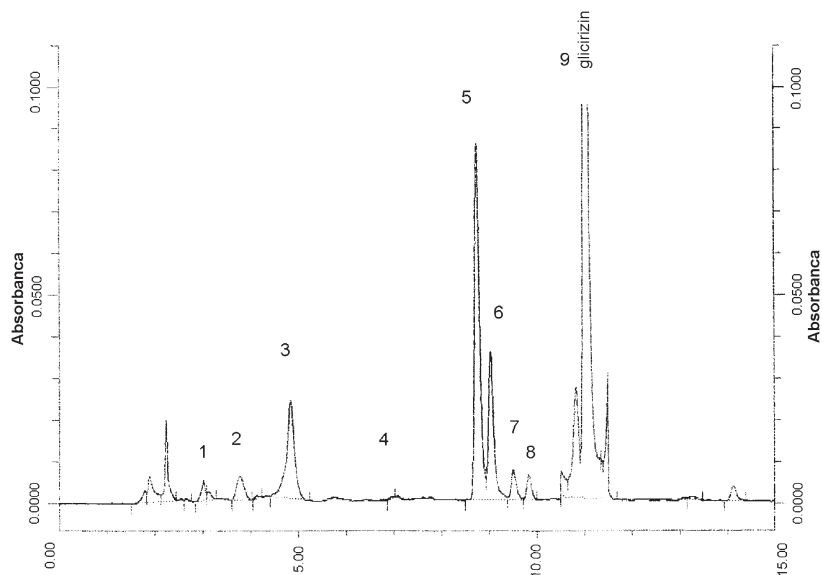
7.3.2 Vbrizgamo 20 µl vzorca (7.1) (vzorec žgane pijače z janežem). Analizo izvedemo pri kromatografskih pogojih, ki so opisani zgoraj (6.5).

7.3.3 Primerjamo oba kromatograma. Podobnost med dvema kromatografoma mora biti velika v območju halkona (med ugotavljanjem pri 370 nm pri zgoraj opisanih pogojih analize.) (Glej Diagram 1)

8. Značilni kromatogram za pastis

Diagram 1

Kromatogram, pridobljen z zgoraj opisano metodo, kaže prisotnost halkona v „pastisu“. Piki 1 do 8 so halkoni in pika 9 glicirizinska kislina.



▼ **M1**9. **Značilnosti rezultatov metode (natančnost)**

Rezultati medlaboratorijskega poskusa:

Naslednja tabela opisuje rezultate ugotavljanja halkona v pastisu in žganih pijačah z aromo janeža.

Naslednji podatki so pridobljeni na podlagi mednarodnega medlaboratorijskega poskusa, ki je opravljen v skladu z mednarodno sprejetimi postopki.

Leto medlaboratorijskega poskusa	1998
Število laboratorijev	14
Število vzorcev	11
Analit	halkoni

Vzorci	A	B	C	D	E	F
Število preostalih laboratorijev po izločitvi	14	14	14	14	14	13
Število izločenih (laboratorijev)	—	—	—	—	—	1 (*)
Število sprejetih rezultatov	28	14	14	28	28	26
Število rezultatov, ki kažejo na prisotnost halkona	28	14	14	0	28	0
Število rezultatov, ki kažejo na odsotnost halkonov	0	0	0	28	0	26
Odstotek pravih rezultatov (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Neskladni rezultati med dvema duplikatoma, ki so pripisani napaki vzorčenja.

Vzorci	G	H	I	J	K
Število preostalih laboratorijev po izločitvi	14	14	14	14	14
Število izločenih (laboratorijev)	—	—	—	—	—
Število sprejetih rezultatov	28	14	14	28	28
Število rezultatov, ki kažejo prisotnost halkonov	0	0	0	0	0
Število rezultatov, ki kažejo na odsotnost halkonov	28	14	14	28	28
Odstotek pravih rezultatov (%)	100	100	100	100	100

Vrste vzorcev:

A pastis, slepi, duplikati

B pastis, posamezni vzorci

C pastis, posamezni vzorci

D „pastis“ (brez vsebnosti halkonov), slepi, duplikati

E „pastis“ (brez vsebnosti halkonov), slepi, duplikati

F liker z janežem (brez vsebnosti halkonov), slepi, duplikat

▼ **M1**

- G liker z janežem (brez vsebnosti halkanov), slepi, duplikat
- H ouzo (brez vsebnosti halkanov), posamezni vzorec
- I ouzo (brez vsebnosti halkanov), posamezni vzorec
- J jane (brez vsebnosti halkanov), slepi duplikati
- K „patis“ (brez vsebnosti halkanov, slepi duplikati.

▼ **M2****VIII. SKUPNI SLADKORJI****1. Področje uporabe**

Za določitev skupnih sladkorjev (izraženih kot invertni sladkor) v žganih pijačah se uporabi metoda HPLC–RI, razen pri likerjih, ki vsebujejo jajčne in mlečne proizvode.

Metoda je bila validirana v medlaboratorijski študiji za pastis, destilirani anis, češnjev liker, crème de (sledi ime uporabljenega sadja ali surovine) in crème de cassis v območju od 10,86 g/l do 509,7 g/l. Vendar pa je bila linearnost odziva instrumenta dokazana za območje koncentracije od 2,5 g/l do 20,0 g/l.

Ta metoda ni namenjena določanju nizkih koncentracij sladkorja.

2. Normativne reference

ISO 3696:1987 Voda za analitično uporabo – specifikacije in preskusne metode.

3. Princip

Analiziranje raztopin sladkorjev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z namenom določitve koncentracije glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze in laktoze.

Ta metoda uporablja stacionarno fazo alkilamin in detekcijo z diferencialno refraktometrijo ter je podana kot primer. Za stacionarno fazo bi bila mogoča tudi uporaba anionske izmenjalne smole.

4. Reagenti in materiali

4.1 Glukoza (CAS 50-99-7) z vsaj 99-odstotno čistostjo.

4.2 Fruktoza (CAS 57-48-7) z vsaj 99-odstotno čistostjo.

4.3 Saharoza (CAS 57-50-1) z vsaj 99-odstotno čistostjo.

4.4 Laktoza (CAS 5965-66-2) z vsaj 99-odstotno čistostjo.

4.5 Monohidrat maltoze (CAS 6363-53-7) z vsaj 99-odstotno čistostjo.

4.6 Čisti acetonitril (CAS 75-05-8) za analizo HPLC.

4.7 Destilirana ali demineralizirana voda, po možnosti mikrofiltrirana.

4.8 Topila (primer)

Elucijsko topilo je sestavljeno iz:

75 volumskih delov acetonitrila (4.6),

25 volumskih delov destilirane vode (4.7).

Pred uporabo za 5–10 minut skozi počasi spustimo helij, da se razplini.

Če ne uporabljamo mikrofiltrirane vode, je treba topilo filtrirati skozi filter za organska topila z velikostjo por do vključno 0,45 µm.

4.9 Absolutni etanol (CAS 64-17-5).

4.10 Raztopina etanola (5 %, v/v).

4.11 Priprava osnovne standardne raztopine (20 g/l)

Odehtamo po 2 g vsakega sladkorja za analizo (4.1 do 4.5) in jih v celoti prenesemo v 100-mililitrsko merilno bučko. (Opomba: 2,11 g monohidrata maltoze je enako 2 g maltoze.)

▼ M2

Do 100 ml poravnamo s 5-odstotno alkoholno raztopino (4.10), pretresemo in shranimo na okoli + 4 °C. Novo osnovno raztopino pripravljamo tedensko.

4.12 Priprava delovne standardne raztopine (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 in 20,0 g/l)

Osnovno raztopino, 20 g/l (4.11), primerno razredčimo s 5-odstotno alkoholno raztopino (4.10), da dobimo pet delovnih standardnih raztopin (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 in 20,0 g/l). Filtriramo skozi filter z velikostjo por do vključno 0,45 µm (5.3).

5. Aparatura in oprema

5.1 Sistem HPLC, ki lahko doseže ločljivost vseh sladkorjev na bazni liniji.

5.1.1 Tekočinski kromatograf visoke ločljivosti s šestpornim ventilom za injiciranje z nameščeno 10-µl zanko ali katero koli drugo napravo (avtomatsko ali ročno) za zanesljivo injiciranje mikrovolumnov.

5.1.2 Črpalni sistem, ki omogoča doseganje in ohranjanje stalnega ali programiranega pretoka z veliko natančnostjo.

5.1.3 Diferencialni refraktometer.

5.1.4 Računalniški integrator ali registrator, katerega delovanje je kompatibilno s preostalimi opremo.

5.1.5 Predkolona:

Priporočeno je, da se ustrezna predkolona pritrdi na analitsko kolono.

5.1.6 Kolona (primer):

Material:	nerjaveče jeklo ali steklo.
Notranji premer:	2–5 mm.
Dolžina:	100–250 mm (odvisno od velikosti delcev polnila), na primer 250 mm, če je premer delcev 5 µm.
Stacionarna faza:	funkcionalne skupine alkilamin, vezane na siliko, največja velikost delcev 5 µm.

5.1.7 Kromatografski pogoji (primer):

Elucijsko topilo (4.8), pretok: 1 ml/min.

Detekcija: diferencialna refraktometrija.

Da se zagotovi popolna stabilnost detektorja, se ga nekaj ur pred uporabo prižge. Referenčno celico je treba napolniti z elucijskim topilom.

5.2 Analizna tehnika z natančnostjo 0,1 mg.

5.3 Oprema za filtriranje majhnih volumnov z uporabo 0,45-µm mikromembrane.

6. Hramba vzorcev

Ob sprejetju se vzorci pred analizo hranijo na sobni temperaturi.

7. Postopek

7.1 DEL A: priprava vzorca

7.1.1 Vzorec pretresemo.

▼ **M2**

7.1.2 Vzorec filtriramo skozi filter z velikostjo por do vključno 0,45 µm (5.3).

7.2 DEL B: HPLC

7.2.1 Določanje

Injiciramo 10 µl standardnih raztopin (4.12) in vzorcev (7.1.2). Analiziramo pri primernih kromatografskih pogojih (na primer takih, kot so opisani zgoraj).

7.2.2 Če je kateri koli odziv detektorja na vzorec višji od odziva za standardno raztopino z najvišjo koncentracijo, je treba vzorec razredčiti z destilirano vodo in ponovno analizirati.

8. Izračun

Primerjamo kromatograma za standardno raztopino in žganje. Vrhove identificiramo glede na retencijski čas. Izmerimo njihovo površino (ali višino), da izračunamo koncentracije po metodi eksterne standarda. Upoštevamo, če smo vzorec razredčili.

Končni rezultat je vsota saharoze, maltoze, laktoze, glukoze in fruktoze, izražena kot invertni sladkor v g/l.

Invertni sladkor se izračuna kot vsota vseh prisotnih monosaharidov in reducirajočih disaharidov ter stehiometrijske količine glukoze in fruktoze, izračunane iz prisotne saharoze.

$$\text{Invertni sladkor (g/l)} = \text{glukoza (g/l)} + \text{fruktoza (g/l)} + \text{maltoza (g/l)} + \text{laktoza (g/l)} + (\text{saharoza (g/l)}) \times 1,05$$

$$1,05 = (\text{molekulska masa fruktoze} + \text{molekulska masa fruktoze}) / \text{molekulska masa saharoze}$$

9. Učinkovitost metode (natančnost)

9.1 Statistični rezultati medlaboratorijskega preskusa

Naslednji podatki izvirajo iz mednarodne študije o učinkovitosti metode, opravljene po mednarodno priznanih postopkih [1] [2].

Leto medlaboratorijskega preskusa	2000
Število laboratorijev	24
Število vzorcev	8

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

[2] Horwitz, W. (1982) „Analytical Chemistry 54, 67A-76A“.

Razpredelnica 1

Fruktoza, glukoza, maltoza

Analit	Fruktoza		Glukoza			Maltoza	
	Crème de Cassis	Standardna raztopina (50 g/l)	Žgane pijače z aromo janeža	Crème de Cassis	Standardna raztopina (50 g/l)	Žgane pijače z aromo janeža	Standardna raztopina (10 g/l)
Vzorci (× 2)							
Srednja vrednost [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Število laboratorijev brez izločitev	21	22	21	23	19	21	22

▼ M2

Analit	Fruktoza		Glukoza			Maltoza	
	Crème de Cassis	Standardna raztopina (50 g/l)	Žgane pijače z aromo janeža	Crème de Cassis	Standardna raztopina (50 g/l)	Žgane pijače z aromo janeža	Standardna raztopina (10 g/l)
Vzorci (× 2)							
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Meja ponovljivosti (r) [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Razpredelnica 2

Saharoza

Analit	Saharoza					
	Pastis	Ouzo	Češnjev liker	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standardna raztopina (100 g/l)
Vzorci						
Srednja vrednost [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Število laboratorijev brez izločitev	19	19	20	18	18	18
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Meja ponovljivosti (r) [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) Dvojna koncentracija.

▼ M2

Razpredelnica 3

Skupni sladkorji

(Opomba: ti podatki so bili izračunani za skupne sladkorje, ne za invertni sladkor, kot je opredeljen v točki 8 zgoraj.)

Vzorci	Pastis	Ouzo	Žgane pijače z aromo janeža	Češnjev likor	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Stan- dardna raztopina (220 g/l)
Srednja vrednost [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Število laboratorijev brez izločitev	20	19	20	20	18	18	19
Standardni odmik ponov- ljivosti (s_r) [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD _r) [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Meja ponovljivosti (r) [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Standardni odmik obno- vljivosti (s_R) [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD _R) [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) Dvojna koncentracija.

▼ M1**IX. RUMENJAK. DOLOČITEV KONCENTRACIJE RUMENJAKA V ŽGANIH PIJAČAH – FOTOMETRIČNA METODA****1. Področje uporabe**

Ta metoda je primerna za določitev koncentracije rumenjaka v razponu med 40 in 250 g/l v jajčnem likerju in likerju z jajci.

2. Normativne reference

ISO 3696:1897 Voda za analitično laboratorijsko uporabo – specifikacija in testne metode.

3. Načelo

Fosforne spojine, topne v etanolu, in jih najdemo v jajcu, se ekstrahirajo in ovrednotijo fotometrično kot fosfomolibdenski kompleks.

4. Reagenti in materiali

4.1 Dvakrat destilirana voda

4.2 Diatomejska zemlja

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

4.4 15 % raztopina magnezijevega acetata (CAS 16674-78-5)

4.5 10 % žveplena kislina (CAS 7664-93-9)

4.6 1 N žveplena kislina

4.7 0,16 g/l raztopine kalijevega dihidrogen fosfata (CAS 778-77-0), KH_2PO_4

4.8 Reagenti za določitev fosfata:

20 g amonijevega molibdata (CAS 12054-85-2), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 400 ml vode pri 50 °C;

v drugi posodi raztopimo 1 g amonijevega vanadata (CAS 7803-55-6) NH_4VO_3 v 300 ml vroče vode, pustimo, da se ohladi, in dodamo 140 ml koncentrirane dušikove kisline (CAS 7697-37-2). Združimo ohlajene raztopine v 1 000-mililitrski merilni bučki in dopolnimo do oznake.

5. Aparature in oprema

5.1 1 100-mililitrska erlenmajerica

5.2 Ultrazvočna kopel (ali magnetno mešalo)

5.3 3 100-mililitrska merilna bučka

5.4 Vodna kopel pri 25 °C

5.5 Filter (whatman št. 4 ali enakovreden)

5.6 Porcelanski (ali platinasti) lonček

5.7 Vodna kopel

5.8 Plošča za izparevanje

5.9 Talilna peč

5.10 50-mililitrska merilna bučka

5.11 20-mililitrska merilna bučka

5.12 Spektrofotometer, nastavljen na 420 nm.

5.13 1-centimetrska kiveta.

▼ M1**6. Vzorci**

Vzorci se pred analizo hranijo na sobni temperaturi.

7. Postopek**7.1 Priprava vzorca**

7.1.1 Stehramo 10 g vzorca v 100-mililitrsko erlenmajerico (5.1).

7.1.2 Postopno dodajamo 70 ml etanola (4.3) v majhnih količinah, obračamo erlenmajerico ob vsakem dodatku, nato damo v ultrazvočno kopel (5.2) za 15 minut (ali mešamo z magnetnim mešalom (5.2) 10 minut na sobni temperaturi).

7.1.3 Vsebinsko erlenmajerice prenesemo v 100-mililitrsko merilno bučko (5.3) ob splakovanju z etanolom (4.3). Do oznake dopolnimo z etanolom (4.3) in damo bučko v vodno kopel pri 20 °C (5.4). Dopolnimo do oznake pri 20 °C.

7.1.4 Dodamo majhno količino diatomejske zemlje (4.2), filtriramo (5.5) in zavrzemo prvih 20 ml.

7.1.5 Prenesemo 25 ml filtrata v porcelanasti (ali platinasti) lonček (5.6). Nato filtrat koncentriramo z izhlapevanjem v vreli vodni kopeli (5.7) ob dodatku 5 ml 15-odstotne raztopine magnezijevega acetata (4.4).

7.1.6 Lonček postavimo na ploščo za izparevanje (5.8) in segrevamo do izsušitve.

7.1.7 Preostanek sežgemo pri 600 °C v peči (5.9), dokler pepel ne pobeli. Postopek naj traja najmanj eno uro in pol, vendar lahko pustimo čez noč.

7.1.8 Pepel prelijemo z 10 ml 10-odstotne žveplene kisline in ga prenesemo ob spiranju z destilirano vodo (4.1) v 50-mililitrsko merilno bučko (5.10) in jo napolnimo do oznake pri sobni temperaturi z destilirano vodo (4.1). 5-milimetrski alikvot te raztopine pepela se uporabi za pripravo vzorčne raztopine za fotometrični preskus.

7.2 Fotometrični preskus**7.2.1 Primerjalne raztopine**

7.2.1.1 10 ml 10-odstotne žveplene kisline (4.5) nalijemo v 50-mililitrsko merilno bučko (5.10) in napolnimo do oznake z destilirano vodo (4.1).

7.2.1.2 5 mililitrom alikvota raztopine (7.2.1.1) v 20-mililitrski merilni bučki (5.11) dodamo 1 ml 1N žveplene kisline (4.6) in 2 ml fosfatovega reagenta (4.8) ter dopolnimo do oznake z destilirano vodo (4.1).

7.2.1.3 Zamašimo z rahlo vstavljenim zamaškom, pretresemo in segrevamo v vreli vodni kopeli (5.7) 10 minut, nato hladimo 20 minut v vodni kopeli pri 20 °C (5.4).

7.2.1.4 Napolnimo 1-centimetrsko kiveto (5.13) s to primerjalno raztopino.

7.2.2 Raztopina vzorca

7.2.2.1 5 mililitrom alikvota raztopine pepela (7.1.8) v 20-mililitrski merilni bučki (5.11) dodamo 1 ml 1 N žveplene kisline (4.6) in 2 ml fosfatovega reagenta (4.8) in dopolnimo do oznake z destilirano vodo (4.1).

▼ M1

7.2.2.2 Zamašimo z rahlo vstavljenim zamaškom, pretresemo in segrevamo v vreli vodni kopeli (5.7) 10 minut, nato hladimo v vodni kopeli 20 minut pri 20 °C (5.4).

7.2.2.3 Rumeno raztopino, ki se razvije, nemudoma analiziramo s spektrofotometrično (5.12) v 1-centimetrski kivetki (5.13) pri 420 nm glede na primerjalne raztopine (7.2.1.4).

7.2.3 Umeritvena krivulja

7.2.3.1 Za izdelavo umeritvene krivulje dodamo 2 ml alikvota fosfatovega reagenta (4.8) v 20-mililitrske merilne bučke (5.11), od katerih vsaka vsebuje 1 ml 1 N žveplene kisline (4.6) in 0, 2, 4, 6, 8, ter 10 ml raztopine kalijevega dihidrogenega fosfata (4.7). Dopolnimo do oznake z destilirano vodo (4.1).

7.2.3.2 Zamašimo z rahlo vstavljenim zamaškom, pretresemo in segrevamo na vreli vodni kopeli (5.7) 10 minut, nato hladimo v vodni kopeli pri 20 °C (5.4) 20 minut ter analiziramo s spektrofotometrom (5.12) v 1-centimetrski kivetki (5.13) pri 420 nm glede na primerjalno raztopino (7.2.1.4).

7.2.3.3 Izdelava kalibracijske krivulje

raztopina dihidrogenega fosfata (ml)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. Navajanje rezultatov

Vsebnost rumenjaka v g/l se izračuna z naslednjo formulo:

$$\text{g/l rumenjaka} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{gostota}}{E/40}$$

pri čemer je:

110	faktor pretvorbe za celotni P ₂ O ₅ v gramih v 100 g rumenjaka
mg P ₂ O ₅	na osnovi umeritvene krivulje ugotovljena vrednost
gostota	masa na enoto prostornine (g/ml) likerja na osnovi rumenjaka pri 20 °C
E	masa likerja na osnovi jajc v gramih
40	faktor razredčitve za 5 ml alikvota raztopine pepela.

9. Značilnosti rezultatov metode (natančnost)

Statistični rezultati medlaboratorijskega poskusa:

naslednja tabela vsebuje vrednosti za rumenjaka.

Naslednji podatki so pridobljeni na podlagi mednarodnega medlaboratorijskega poskusa, ki je opravljen v skladu z mednarodno sprejetimi postopki.

Leto interlaboratorijskega testa:	1998
Število laboratorijev:	24
Število vzorcev:	5
Analit:	rumenjaka

▼ M1

Vzorci	A	B	C	D	E
Število preostalih laboratorijev po izločitvi	19	20	22	20	22
Število izločenih (laboratorijev)	3	4	2	4	2
Število sprejetih rezultatov	38	40	44	40	44
Srednja vrednost	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Standardni odklon ponovljivosti (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Relativni standardni odklon ponovljivosti (RSD_R) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Meja ponovljivosti (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Standardni odklon obnovljivosti (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Relativni standardni odklon obnovljivosti (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Meja obnovljivosti (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Vrste vzorcev

- A Advocaat, slepi duplikati
- B Advocaat, slepi duplikati
- C Advocaat, slepi duplikati
- D Advocaat (razredčen), vrednosti split (*)
- E Advocaat, slepi duplikati

▼ **M2**

X. DOLOČITEV NASLEDNJIH SPOJIN, VSEBOVANIH V LESU, V ŽGANIH PIJAČAH S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC): FURFURALA, 5-HIDROKSIMETILFURFURALA, 5-METILFURFURALA, VANILINA, SIRINGALDEHIDA, KONIFERALDEHIDA, SINAPALDEHIDA, GALNE KISLINE, ELAGIČNE KISLINE, VANILINSKE KISLINE, SIRINGINSKE KISLINE IN SKOPOLETINA

1. Področje uporabe

Metoda se uporablja za določanje furfurala, 5-hidroksimetilfurfurala, 5-metilfurfurala, vanilina, siringaldehyda, koniferaldehyda, sinapaldehyda, galne kisline, elagične kisline, vanilinske kisline, siringinske kisline in skopoletina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

2. Normativna referenca

Analizna metoda, ki jo je priznala generalna skupščina Mednarodnega urada za trto in vino (OIV) in jo je ta urad objavil pod referenco *OIV-MA-BS-16: R2009*.

3. Princip

Določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) in detekcija z ultravijolično spektrofotometrijo pri različnih valovnih dolžinah in s spektrofotometrijo.

4. Reagenti

Reagenti morajo biti analitsko čisti. Uporabljena voda mora biti destilirana voda ali voda vsaj enakovredne čistosti. Bolje je uporabiti mikrofiltrirano vodo z upornostjo 18,2 M Ω .cm.

4.1 96 % vol. alkohol.

4.2 Metanol HPLC-čistosti (topilo B).

4.3 Ocetna kislina, razredčena na 0,5 % vol. (topilo A).

4.4 Mobilne faze: (navedeno samo kot primer).

Topilo A (0,5-odstotna očetna kislina) in topilo B (čisti metanol). Filtriramo skozi membrano (s poroznostjo 0,45 μ m). Po potrebi razplinimo v ultrazvočni kopeli.

4.5 Referenčni standardi najmanj 99-odstotne čistosti: furfural, 5-hidroksimetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilin, siringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, galna kislina, elagična kislina, vanilinska kislina, siringinska kislina in skopoletin.

4.6 Referenčna raztopina: standardne snovi so raztopljene v 50-odstotni vodno-alkoholni raztopini. Končne koncentracije referenčne raztopine bi morale biti:

furfural: 5 mg/l; 5-hidroksimetilfurfural: 10 mg/l; 5-metilfurfural: 2 mg/l; vanilin: 5 mg/l; siringaldehyd: 10 mg/l; koniferaldehyd: 5 mg/l; sinapaldehyd: 5 mg/l; galna kislina: 10 mg/l; elagična kislina: 10 mg/l; vanilinska kislina 5 mg/l; siringinska kislina: 5 mg/l; skopoletin: 0,5 mg/l.

5. Aparatura

Standardna laboratorijska aparatura

5.1 Tekočinski kromatograf visoke ločljivosti, ki lahko deluje v binarnem gradientnem načinu in ima naslednjo opremo:

5.1.1 Spektrofotometrični detektor, ki lahko meri valovne dolžine od 260 do 340 nm. Vendar je bolj priporočljiva uporaba detektorja z nastavljivo valovno dolžino z nizom diod ali podobne naprave, da se potrди čistost vrhov.

▼ M2

- 5.1.2 Spektrofotometrični detektor – valovna dolžina vzbujanja: 354 nm, valovna dolžina emisije: 446 nm (za določanje sledov skopoletina; ta je zaznaven tudi pri 313 nm s spektrofotometrijo).
- 5.1.3 Naprava za injiciranje, ki lahko vnese 10 ali 20 µl (na primer) analiznega vzorca.
- 5.1.4 Kolona tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, tip RP C18, največja velikost delcev 5 µm.
- 5.2 Brizgalke za HPLC.
- 5.3 Naprava za membransko filtracijo majhnih volumnov.
- 5.4 Računalniški integrator ali registrator, katerega delovanje je kompatibilno s celotno aparaturo; zlasti mora imeti več kanalov za povezavo.

6. Postopek**6.1 Priprava raztopine za injiciranje**

Referenčno raztopino in žgano pijačo po potrebi filtriramo skozi membrano z največjim premerom por 0,45 µm.

- 6.2 Operativni pogoji za kromatografijo: analizo izvedemo pri temperaturi prostora z opremo, opisano v točki 5.1, in z uporabo mobilnih faz (4.4) s pretokom približno 0,6 mililitrov na minuto z uporabo spodnjega gradienta (navedeno samo kot primer):

čas: 0 min 50 min 70 min 90 min

topilo A (voda-kislina) 100 % 60 % 100 % 100 %

topilo B (metanol): 0 % 40 % 0 % 0 %

Upoštevajte, da je treba gradient v nekaterih primerih prilagoditi, da se izognemo sočasni eluciji.

6.3 Določanje**6.3.1 Referenčne standarde injiciramo ločeno, nato mešano.**

Operativne pogoje prilagodimo tako, da so resolucijski faktorji vrhov vseh spojin najmanj enaki 1.

6.3.2 Injiciramo vzorec, pripravljen v skladu s točko 6.1.**6.3.3 Izmerimo površino vrhov v referenčni raztopini in žgani pijači ter izračunamo koncentracije.****7. Prikaz rezultatov**

Koncentracijo posamezne sestavine izrazimo v mg/l.

8. Učinkovitost metode (natančnost)

Naslednji podatki izvirajo iz mednarodne študije iz leta 2009 o učinkovitosti metode za različne žgane pijače, opravljene po mednarodno priznanih postopkih [1], [2].

8.1 Furfural

Analit	Furfural					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev	15	15	15	15	15	15
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)	14	12	13	14	13	13

▼ M2

Analit	Furfural					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Vzorci						
Srednja vrednost [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]	8	15	5	13	3	5
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2 5-hidroksimetilfurfural

Analit	5-hidroksimetilfurfural					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Vzorci						
Število sodelujočih laboratorijev	16	16	16	16	16	16
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)	14	14	14	14	14	14
Srednja vrednost [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]	8	9	5	13	7	9
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3 5-metilfurfural

Analit	5-metilfurfural					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Vzorci						
Število sodelujočih laboratorijev	11	11	11	11	11	11
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)	11	11	8	11	10	11

▼ M2

Analit	5-metilfurfural					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Srednja vrednost [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Standardni odklik ponovljivosti (s_r) [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Relativni standardni odklik ponovljivosti (RSD_r) [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Standardni odklik obnovljivosti (s_R) [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Relativni standardni odklik obnovljivosti (RSD_R) [%]	35	18	22	39	12	35
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4 Vanilin

Analit	Vanilin					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev	16	15	16	16	16	16
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)	16	15	16	16	16	16
Srednja vrednost [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Standardni odklik ponovljivosti (s_r) [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09
Relativni standardni odklik ponovljivosti (RSD_r) [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Standardni odklik obnovljivosti (s_R) [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Relativni standardni odklik obnovljivosti (RSD_R) [%]	19	25	15	22	13	16
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5 Siringaldehid

Analit	Siringaldehid					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev	16	15	16	16	16	16
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)	13	13	13	12	14	13

▼ M2

Analit	Siringaldehid						
	Vzorci	Viski	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Srednja vrednost [mg/l]		1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]		0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]		2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]		0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]		8	33	5	6	4	4
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6 Koniferaldehid

Analit	Koniferaldehid						
	Vzorci	Viski	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev		13	12	13	12	13	13
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)		12	12	13	12	13	13
Srednja vrednost [mg/l]		0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]		0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]		9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]		0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]		23	27	21	23	8	19
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7 Sinapaldehid

Analit	Sinapaldehid						
	Vzorci	Viski	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev		14	14	14	14	15	14
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)		14	13	12	13	13	12

▼ M2

Analit	Sinapaldehid					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Srednja vrednost [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]	31	27	46	13	10	73
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8 Galna kislina

Analit	Galna kislina					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev	16	15	16	16	16	16
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)	15	14	16	16	16	16
Srednja vrednost [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]	36	47	31	53	30	35
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9 Elagična kislina

Analit	Elagična kislina					
	Vizki	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev	7	7	7	7	7	7
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)	7	7	7	7	7	6

▼ M2

Analit	Elagična kislina						
	Vzorci	Viski	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Srednja vrednost [mg/l]		3,2	1,0	9,5	13	13	36
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]		0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]		6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]		1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]		44	43	42	39	39	40
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		4,0	1,2	11	14	14	40

8.10 Vanilinska kislina

Analit	Vanilinska kislina						
	Vzorci	Viski	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev		15	15	15	15	15	15
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)		12	11	14	14	15	14
Srednja vrednost [mg/l]		0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]		0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]		14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]		0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]		28	20	35	31	51	26
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11 Siringinska kislina

Analit	Siringinska kislina						
	Vzorci	Viski	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev		16	15	16	16	16	16
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)		16	15	15	15	16	15

▼ M2

Analit	Siringinska kislina						
	Vzorci	Viski	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Srednja vrednost [mg/l]		0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]		0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]		6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]		0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]		19	29	11	18	13	14
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12 Skopoletin

Analit	Skopoletin						
	Vzorci	Viski	Vinjak	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Število sodelujočih laboratorijev		10	10	10	10	10	10
Število sprejetih rezultatov (laboratoriji)		9	8	9	8	8	8
Srednja vrednost [mg/l]		0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Standardni odmik ponovljivosti (s_r) [mg/l]		0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Relativni standardni odmik ponovljivosti (RSD_r) [%]		2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Meja ponovljivosti (r) [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Standardni odmik obnovljivosti (s_R) [mg/l]		0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Relativni standardni odmik obnovljivosti (RSD_R) [%]		15	16	23	17	15	15
Meja obnovljivosti (R) [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06

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

[2] Horwitz, W. (1982) „Analytical Chemistry 54, 67A-76A“.

▼ **M3****XI. DOLOČANJE VSEBNOSTI ¹⁴C V ETANOLU****1 Uvod**

Določanje vsebnosti ¹⁴C v etanolu omogoča razlikovanje med alkoholom iz fosilnih goriv (sintezni alkohol) in alkoholom iz surovin nedavnega izvora (fermentacijski alkohol).

2 Opredelitev

Vsebnost ¹⁴C v etanolu se šteje za vsebnost ¹⁴C, ki se določi z uporabo tu opisane metode ali metode iz standarda EN 16640, metoda C.

Naravna vsebnost ¹⁴C v atmosferi (referenčna vrednost), ki jo z asimilacijo absorbira živo rastlinstvo, ni konstantna. Referenčna vrednost se zato določi za etanol iz surovin zadnje rastne dobe. Ta letna referenčna vrednost se določi s standardom EN 16640. Lahko pa se sprejme druga referenčna vrednost, če jo potrdi akreditirani organ.

3 Princip

Vsebnost ¹⁴C vzorcev, ki vsebujejo alkohol z vsaj 85 mas. % etanola, se določi neposredno s tekočinskim scintilacijskim štetjem.

4 Reagenti**4.1 Toluenski scintilator**

5,0 g 2,5-difeniloksazol (PPO)

0,5 g p-bis-[4-metil-5-feniloksazolil(2)]-benzen (dimetil-POPOP) v 1 litru toluena analizne kakovosti.

Prav tako se lahko uporabijo komercialni toluenski scintilatorji enake sestave, pripravljeni za uporabo.

4.2 Standard ¹⁴C

n-heksadekan ¹⁴C z aktivnostjo približno 1×10^6 dpm/g (približno $1,67 \times 10^6$ cBq/g) in zagotovljena točnost določene aktivnosti ± 2 rel. %

4.3 Etanol brez ¹⁴C

Sintezni alkohol iz surovin fosilnega izvora z vsaj 85 mas. % etanola za določitev ozadja.

4.4 Alkohol iz surovin nedavnega izvora zadnjega obdobja rasti z vsaj 85 mas. % etanola kot referenčni material.**5 Oprema**

5.1 Večkanalni tekočinski scintilacijski spektrometer s procesorjem in avtomatsko eksterno standardizacijo ter prikazom razmerja med eksternim standardom in kanalom (običajna zasnova: trije merilni kanali in dva kanala za eksterni standard).

5.2 Šteвне cevi z nizko vsebnostjo kalija, primerne za spektrometer, s temnimi navojnimi zamaški, ki vsebujejo polietilenski vložek.

5.3 Merilne pipete, 10 ml.

5.4 Avtomatska odmerna naprava, 10 ml.

5.5 250-mililitrska bučka z okroglim dnom in brušenim zamaškom.

5.6 Naprava za destilacijo alkohola z grelno oblogo, na primer vrsta Micko.

5.7 Mikrolitrska brizga, 50 μ l.

▼ **M3**

5.8 Lij za piknometar in piknometri, 25 ml in 50 ml. Kot alternativa se dovoli enakovredna oprema, na primer elektronski denzimeter.

5.9 Termostat s stabilnostjo temperature $\pm 0,01$ °C.

6 Postopek

6.1 Nastavitev opreme

Oprema se nastavi po navodilih proizvajalca. Merilni pogoji so optimalni, ko je vrednost E_2/B , tj. indeks kakovosti, maksimalna.

E = učinkovitost

B = ozadje

Le dva merilna kanala sta optimizirana. Tretji je za namene kontrole v celoti odprt.

6.2 Izbira števnih cevi

Večje število števnih cevi, ki bodo potrebne kasneje, se napolni z 10 ml sinteznega etanola brez ^{14}C in 10 ml toluenskega scintilatorja. Merjenje pri vsaki poteka vsaj 4 cikle po 100 minut. Cevi, katerih ozadje za več kot ± 1 rel. % odstopa od povprečja, se zavržejo. Lahko se uporabijo le tovarniško nove cevi iz iste serije.

6.3 Določitev razmerja med eksternim standardom in kanalom (ESCR)

Med postopkom nastavitve kanalov (6.1) se ESCR določi z uporabo ustreznega računalniškega programa, ko se določi učinkovitost. Uporabljeni eksterni standard je $^{137}\text{cezij}$, ki ga je že vgradil proizvajalec.

6.4 Priprava vzorca

Za merjenje so primerni vzorci, ki imajo vsebnost etanola vsaj 85 mas. % in ne vsebujejo nečistoč ter absorbirajo na valovnih dolžinah pod 450 nm. Nizka vsebnost ostankov estrov in aldehydov ni moteča. Vsebnost alkohola v vzorcu se predhodno določi s približkom 0,1 %.

7 Merjenje vzorcev z eksternim standardom

7.1 Vzorci z nizko absorbanco, kot so opisani v točki 6.4, z vrednostjo ESCR okoli 1,8, se lahko merijo z ESCR, ki je kazalec razmerja učinkovitosti.

7.2 Merjenje

10 ml od vsakega vzorca, pripravljenega v skladu s točko 6.4, se s pipeto odmeri v izbrano števno cev, pregledano za ozadje, čemur se z avtomatsko dozirno napravo doda 10 ml toluenskega scintilatorja. Vzorci v ceveh se homogenizirajo z ustreznim vrtenjem; tekočina ne sme zmočiti polietilenskega vložka v navojnem zamašku. Na enak način se pripravi cev s fosilnim etanolom brez ^{14}C za izmero ozadja. Za pregled ustrezne letne vrednosti ^{14}C se pripravi duplikat nedavno pridobljenega etanola iz zadnje rastne dobe, pri čemer se ena cev zmeša z internim standardom, glej točko 8.

Kontrolni vzorci in vzorci ozadja se postavijo na začetek serije meritev, ki vsebuje največ 10 vzorcev za analizo. Celotni merilni čas na vzorec je vsaj 2×100 minut, pri čemer se posamezni vzorci merijo v več stopnjah po 100 minut, da se lahko zaznajo kakršne koli napačne meritve zaradi opreme ali druge napake. (En cikel tako ustreza meritvenemu intervalu 100 minut na vzorec).

Vzorci ozadja in kontrolni vzorci se na novo pripravijo vsake štiri tedne.

▼ **M3**

Pri vzorcih z nizko absorbanco (ESCR približno 1,8) sprememba te vrednosti zanemarljivo vpliva na učinkovitost. Če je sprememba znotraj ± 5 rel. %, se lahko pričakuje ista učinkovitost. Za vzorce z višjo absorbanco, kot so denaturizirani alkoholi, se učinkovitost lahko doseže s krivuljo popravka zaradi ekstinkcije. Če ustrezeni računalniški program ni na voljo, se uporabi interni standard, s čimer se dobi nedvoumen rezultat.

8 Merjenje vzorcev z internim standardom heksadekana ^{14}C

8.1 Postopek

Kontrolni vzorec in vzorec ozadja (nedavno pridobljeni in fosilni etanol) ter neznan material se vsak izmeri v duplikatu. En vzorec duplikata se pripravi v neizbrani cevi, doda se natančno odmerjena količina (30 μl) heksadekana ^{14}C kot interni standard (dodana aktivnost okoli 26 269 dpm/gC (približno 43 782 cBq/gC)). Za pripravo vzorca in čas merjenja drugih vzorcev glej točko 7.2; čas merjenja za vzorce z internim standardom se lahko zmanjša na približno pet minut s prednastavitvijo na 10^5 impulzov. Na meritveno serijo se uporabi en duplikat vsakega vzorca ozadja in kontrolnega vzorca, ki se postavitva na začetek meritvene serije.

8.2 Ravnanje z internim standardom in števnimi cevmi

Za preprečitev kontaminacije pri merjenju z internim standardom je treba interne standarde in šteвне cevi hraniti in uporabljati daleč stran od prostora, v katerem se pripravljajo in merijo vzorci za analizo. Po merjenju se lahko cevi, pregledane za ozadje, ponovno uporabijo. Navojni zamaški in cevi, ki vsebujejo interni standard, se zavržejo.

9 Prikaz rezultatov

9.1 Enota aktivnosti radioaktivne snovi je becquerel; 1 Bq = 1 razpad/sek.

Navedba specifične radioaktivnosti je izražena kot becquerel na gram ogljika = Bq/gC.

Za bolj praktične rezultate se ta izrazi v centibecquerelih = cBq/gC.

Uporabijo se lahko tudi opisi in formule, uporabljene v literaturi, ki temeljijo na dpm. Za ustrezne rezultate v cBq se vrednost dpm zgolj pomnoži s 100/60.

9.2 Izražanje rezultatov z eksternim standardom

$$\text{cBq/g C} = \frac{(\text{cpm}_{\text{pr}} - \text{cpm}_{\text{NE}}) \cdot 1,918 \cdot 100}{V \cdot F \cdot Z \cdot 60}$$

9.3 Izražanje rezultatov z internim standardom

$$\text{cBq/g C} = \frac{(\text{cpm}_{\text{pr}} - \text{cpm}_{\text{NE}}) \cdot \text{dpm}_{\text{IS}} \cdot 1,918 \cdot 100}{(\text{cpm}_{\text{IS}} - \text{cpm}_{\text{pr}}) \cdot V \cdot F \cdot 60}$$

9.4 Okrajšave

cpm_{pr} = srednja stopnja merjenja vzorca v celotnem meritvenem času

▼ M3

- cpm_{NE} = srednja stopnja impulzov ozadja, izračunana na enak način
- cpm_{IS} = stopnja merjenja vzorcev z internim standardom
- dpm_{IS} = količina dodanega internega standarda (umeritvena radioaktivnost dpm)
- V = količina uporabljenih vzorcev v ml
- F = vsebnost čistega alkohola v gramih na ml glede na njegovo koncentracijo
- Z = učinkovitost glede na vrednost ESCR
- 1,918 = število gramov alkohola na gram ogljika

10 Zanesljivost metode**10.1 Ponovljivost (r)**

$$r = 0,632 \text{ cBq/g C}; S_{(r)} = \pm 0,223 \text{ cBq/g C}$$

10.2 Obnovljivost (R)

$$R = 0,821 \text{ cBq/g C}; S_{(R)} = \pm 0,290 \text{ cBq/g C.}$$