

**REGOLAMENTO (CE) N. 2091/2002 DELLA COMMISSIONE
del 26 novembre 2002**

recante modifica del regolamento (CE) n. 2870/2000 che definisce i metodi d'analisi comunitari di riferimento applicabili nel settore delle bevande spiritose

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

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

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento (CE) n. 2870/2000 della Commissione, del 19 dicembre 2000, che definisce i metodi d'analisi comunitari di riferimento applicabili nel settore delle bevande spiritose⁽²⁾, descrive tali metodi in allegato.
- (2) Quattro metodi d'analisi per la determinazione, rispettivamente, dell'anetolo nelle bevande spiritose all'anice, dell'acido glicirrizico e dei calconi nel pastis e del giallo d'uovo nei liquori all'uovo e a base d'uovo, sono stati convalidati secondo criteri riconosciuti a livello internazionale, nell'ambito di un'azione di ricerca sovvenzionata dalla Commissione.
- (3) Questi quattro metodi possono essere riconosciuti come metodi comunitari di riferimento e devono essere aggiunti all'allegato del regolamento (CE) n. 2870/2000.

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

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato del regolamento (CE) n. 2870/2000 è modificato come segue.

- 1) Nell'indice dell'allegato, i termini «(p.m.)» sono soppressi ai punti V, VI, VII e IX.
- 2) Dopo il capitolo III sono aggiunti i capitoli V, VI, VII e IX che figurano nell'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

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

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

Fatto a Bruxelles, il 26 novembre 2002.

Per la Commissione
Franz FISCHLER
Membro della Commissione

⁽¹⁾ GU L 160 del 12.6.1989, pag. 1.

⁽²⁾ GU L 333 del 29.12.2000, pag. 20.

ALLEGATO

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

1. **Campo di applicazione**

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

2. **Riferimenti normativi**

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

3. **Principio**

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

4. **Reagenti e materiali**

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

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

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

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

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

4.4. Etanolo, 45 % in vol.

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

4.5. Preparazione delle soluzioni di calibrazione

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

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

Preparare le soluzioni madri settimanalmente.

4.5.1. Soluzione di calibrazione A

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

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

4.5.2. Soluzione dello standard interno B

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

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

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

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

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

4.5.4. Soluzione di calibrazione C

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

5. **Apparecchiatura e materiale**

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

5.2. Iniettore tipo Split/Splitless

5.3. Colonna capillare (a titolo esemplificativo):

Lunghezza: 50 m

Diametro interno: 0,32 mm

Spessore del film: 0,2 µm

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

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

6. **Condizioni cromatografiche**

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

6.1. Gas di trasporto: elio di qualità analitica

6.2. Portata: 2 ml/min

6.3. Temperatura dell'iniettore: 250 °C

6.4. Temperatura del rivelatore: 250 °C

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

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

7. **Campioni**

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

8. **Procedimento**

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

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

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

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

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

- 8.3. Prova in bianco
- Pipettare 2 ml di soluzione dello standard interno B (4.5.2) in un matraccio tarato da 20 ml; portare a volume con etanolo al 45 % in vol. (4.4) e miscelare accuratamente.
- 8.4. Prova della linearità della risposta
- Prima di cominciare l'analisi, controllare la linearità della risposta del rivelatore a ionizzazione di fiamma iniettando per tre volte successive ognuna delle soluzioni di calibrazione per il controllo della linearità (4.5.3).
- In base ai valori delle aree o delle altezze dei picchi fornite dall'integratore, tracciare, per ogni iniezione, un grafico della concentrazione della soluzione madre in g/l in funzione del rapporto R di ciascuna.
- $R = \text{altezza o area del picco del trans-anetolo} / \text{altezza o area del picco dell'estragolo}$
- Dovrebbe risultare un grafico lineare.
- 8.5. Determinazione
- Iniettare la soluzione del bianco (8.3), poi la soluzione C (4.5.4), poi una delle soluzioni per il controllo della linearità (4.5.3) che funzionerà come campione per il controllo di qualità (questa potrebbe essere scelta tenendo conto del probabile tenore di trans-anetolo nel campione), poi cinque campioni in analisi (8.2); inserire un campione di linearità (controllo di qualità) ogni cinque campioni in analisi per appurare la stabilità analitica.
9. **Calcolo del fattore di risposta**
- Misurare le aree dei picchi (utilizzando un integratore o un altro sistema di trattamento dei dati) o le altezze dei picchi (integrazione manuale) del trans-anetolo e quelle dei picchi dello standard interno.
- 9.1. Calcolo del fattore di risposta (RF_i)
- Il fattore di risposta si calcola come segue:
- $$RF_i = (C_i / \text{area o altezza}_i) * (\text{area o altezza}_{is} / C_{is})$$
- dove:
- C_i = concentrazione del trans-anetolo nella soluzione A (4.5.1)
- C_{is} = concentrazione dello standard interno nella soluzione B (4.5.2)
- area_i = area (o altezza) del picco del trans-anetolo
- area_{is} = area (o altezza) del picco dello standard interno
- RF_i è calcolato a partire dalle cinque iniezioni della soluzione C (4.5.4).
- 9.2. Analisi delle soluzioni utilizzate per controllare la linearità della risposta
- Iniettare le soluzioni utilizzate per controllare la linearità della risposta (4.5.3).
- 9.3. Analisi del campione
- Iniettare la soluzione del campione in analisi (8.2).
10. **Calcolo dei risultati**
- La formula per calcolare la concentrazione del trans-anetolo è la seguente:
- $$c_i = C_{is} * (\text{area o altezza}_i / \text{area o altezza}_{is}) * RF_i$$
- dove:
- c_i = concentrazione del trans-anetolo nel campione in analisi
- C_{is} = concentrazione dello standard interno nel campione in analisi (4.5.2)
- area o altezza_i = area o altezza del picco del trans-anetolo
- $\text{area o altezza}_{is}$ = area o altezza del picco dello standard interno
- RF_i = fattore di risposta (calcolato come indicato al punto 9.1)
- La concentrazione del trans-anetolo è espressa in grammi per litro, con una cifra decimale.

11. Verifica e controllo della qualità

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

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

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

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

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

12.1. Principio

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

12.2. Reagenti

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

12.2.1. Solfato di ammonio, anidro (CAS 7783-20-2)**12.2.2. Fosfato di sodio, bibasico, dodecaidrato (CAS 10039-32-4)****12.3. Apparecchiatura e materiali**

Beute, imbuti separatori, frigorifero.

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

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

12.4.2. Estrazione

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

Agitare la beuta per almeno 30 minuti. A questo scopo si può utilizzare un agitatore meccanico, ma non un agitatore magnetico rivestito di Teflon, in quanto il Teflon assorbirebbe parte dell'analita. Si noti che i sali aggiunti non si scioglieranno completamente.

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

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

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

12.4.3. Preparazione del campione estratto da analizzare

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

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

12.5. Determinazione

Seguire la procedura indicata al punto 8.5.

12.6. Espressione dei risultati

Utilizzare la seguente formula:

$$C_i = (m_{is}/V) * (area_i/area_{is}) * RF_i$$

dove:

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

V = volume del campione non noto (50 ml)

RF_i = fattore di risposta (9.1)

$area_i$ = area del picco del trans-anetolo

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

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

12.7. Verifica e controllo della qualità

Seguire la procedura indicata al punto 11.

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

Risultati statistici delle prove interlaboratorio:

Le seguenti tabelle indicano i risultati per l'anetolo.

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

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

Pastis:

Campioni	A	B	C	D	E	F
Numero di laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	15	15	15	13	16	16
Numero di risultati aberranti (laboratori)	1	1	1	3	—	—
Numero di risultati accettati	30	30	30	26	16	16
Media in g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Deviazione standard della ripetibilità (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSD _r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Limite di ripetibilità (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Deviazione standard della riproducibilità (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSD _R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limite di riproducibilità (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Tipi di campione:

A Pastis; in doppio cieco

B Pastis; in doppio cieco

C Pastis; in doppio cieco

D Pastis; in doppio cieco

E Pastis; campione unico

F Pastis; campione unico

Altre bevande spiritose all'anice:

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

Tipi di campione:

G Ouzo; frazione (*)

H Anice; in doppio cieco

I Liquori all'anice; in doppio

J Liquori all'anice; in doppio

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

1. Campo di applicazione

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

2. Riferimenti normativi

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

3. Principio

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

4. Reagenti

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

- 4.1. Etanolo al 96 % in vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Glicirrinato monoammonico, $C_{42}H_{62}O_{16} \cdot NH_3$ (acido glicirrizico e sale ammonico)
Massa molecolare: 839,98 (CAS 53956-04-0): purezza non inferiore al 90 %.
Massa molecolare dell'acido glicirrizico: 822,94
- 4.3. Acido acetico glaciale, CH_3COOH (CAS 64-19-7)
- 4.4. Metanolo, CH_3OH (CAS 67-56-1)
- 4.5. Etanolo, 50 % vol.
Per 1 000 ml a 20 °C:
— etanolo, 96 % vol. (4.1): 521 ml
— acqua (2.0): 511 ml
- 4.6. Preparazione delle soluzioni di eluizione per l'analisi per HPLC
 - 4.6.1. Solvente di eluizione A (a titolo di esempio)
80 parti in volume d'acqua (2.0)
20 parti in volume di acido acetico (4.3).
Degasare il solvente di eluizione per 5 minuti.
Nota: Se l'acqua utilizzata non è microfiltrata, è opportuno filtrare il solvente di eluizione mediante un filtro per solventi organici con diametro dei pori non superiore a 0,45 µm.
 - 4.6.2. Solvente di eluizione B
Metanolo (4.4)
- 4.7. Preparazione delle soluzioni di calibrazione
Ripreparare tutte le soluzioni di taratura dopo due mesi.
 - 4.7.1. Soluzione di riferimento C
Pesare 25 mg di glicirrinato monoammonico (4.2), con un'approssimazione di 0,1 mg, in un matraccio tarato da 100 ml. Aggiungere etanolo al 50 % in vol. (4.5) e sciogliere il glicirrinato monoammonico; portare poi a volume con etanolo al 50 % in vol. (4.5).
Filtrare con un filtro per solventi organici.
 - 4.7.2. Soluzioni utilizzate per controllare la linearità della risposta degli strumenti
Una soluzione madre di 1,0 g/l è preparata pesando, con un'approssimazione di 0,1 mg, 100 mg di glicirrinato monoammonico in un matraccio tarato da 100 ml. Aggiungere etanolo 50 % vol (4.5) e sciogliere il glicirrinato monoammonico; portare poi a volume con etanolo 50 % vol (4.5).
Almeno altre 4 soluzioni corrispondenti a 0,05, 0,1, 0,25 e 0,5 g/l di glicirrinato monoammonico vengono preparate: prelevare 5 ml, 10 ml, 25 ml e 50 ml della soluzione madre a 1,0 g/l e pipettarle separatamente in matracci tarati da 100 ml; portare a volume con etanolo 50 % vol. (4.5); miscelare accuratamente.
Filtrare con un filtro per solventi organici.
5. **Apparecchiature e materiali**
 - 5.1. Sistema di separazione.
 - 5.1.1. Cromatografo liquido ad alte prestazioni.
 - 5.1.2. Sistema di pompaggio che permetta di ottenere e mantenere un flusso costante o programmato con elevata precisione.
 - 5.1.3. Sistema di rivelazione per spettrofotometria nell'UV da regolare su una lunghezza d'onda di 254 nm.
 - 5.1.4. Sistema di degasaggio dei solventi.
 - 5.2. Integratore calcolatore o registratore compatibili con il sistema cromatografico disponibile.

- 5.3. Colonna (a titolo d'esempio):
 Materiale: acciaio inossidabile o vetro
 Diametro interno: 4-5 mm
 Lunghezza: 100-250 mm
 Fase stazionaria: silice innestata con gruppi funzionali ottadecilenici (C18) a granulometria preferibilmente sferica non superiore a 5 µm.
- 5.4. Materiale da laboratorio
- 5.4.1. Bilancia da laboratorio, precisione: 0,1 mg.
- 5.4.2. Vetreria tarata di classe A.
- 5.4.3. Dispositivo di filtrazione per piccoli volumi su micromembrana.

6. Condizioni cromatografiche

- 6.1. Caratteristiche di eluizione (a titolo d'esempio):
 — Flusso dell'eluente: 1 ml/minuto
 — Solvente A = 30 %
 — Solvente B = 70 %
- 6.2. Rivelazione
 — Lunghezza d'onda = 254 nm.

7. Procedimento

- 7.1. Preparazione del campione di bevanda spiritosa.
 Filtrare se necessario attraverso un filtro per solventi organici (diametro pori: 0,45 µm).
- 7.2. Determinazione
 Dopo stabilizzazione delle condizioni cromatografiche:
 — iniettare 20 µl della soluzione di riferimento C (4.7.1),
 — iniettare 20 µl del campione da analizzare,
 — confrontare i due cromatogrammi ottenuti. Identificare i picchi dell'acido glicirrizico in base al loro tempo di ritenzione; misurarne l'area (o l'altezza) e calcolare la sua concentrazione in g/l con due cifre decimali, servendosi della relazione:

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

dove:

- c = concentrazione dell'acido glicirrizico, in grammi per litro, nella bevanda spiritosa analizzata
 C = concentrazione di glicirrizinato monoammonico, in grammi per litro, nella soluzione di riferimento
 H = area (o altezza) del picco dell'acido glicirrizico della soluzione di riferimento
 h = area (o altezza) del picco dell'acido glicirrizico della bevanda spiritosa analizzata
 P = purezza del glicirrizinato monoammonico, standard di riferimento (in %)
 823 = massa molare dell'acido glicirrizico
 840 = massa molare del glicirrizinato monoammonico.

8. Efficienza del metodo (precisione)

Risultati statistici delle prove interlaboratorio:
 Le seguenti tabelle indicano i risultati relativi all'acido glicirrizico.

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

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

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

Tipi di campione:

- A Pastis; in doppio cieco
- B Pastis; frazione (*)
- C Pastis; in doppio cieco
- D Pastis; in doppio cieco
- E Pastis; in doppio cieco

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

1. Campo di applicazione

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

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

2. Riferimenti normativi

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

3. Principio

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

4. Reagenti

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

- 4.1. Etanolo, 96 % in vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Acetonitrile, CH_3CN , (CAS 75-05-8)

- 4.3. Sostanza di riferimento: *Glycyrrhiza glabra*: liquirizia, «legno dolce»
Legno di liquirizia (*Glycyrrhiza Glabra*) grossolanamente macinato. Dimensione media delle particelle di tipo a «bastoncino»: lunghezza 10-15 cm, spessore 1-3 mm.
- 4.4. Acetato di sodio, CH₃COONa (CAS 127-09-3)
- 4.5. Acido acetico glaciale, CH₃COOH (CAS 64-19-7)
- 4.6. Preparazione delle soluzioni
- 4.6.1. Etanolo, 50 % in vol.
Per 1 000 ml, miscelare, a 20 °C:
— etanolo, 96 % in vol. (4.1): 521 ml
— acqua (2.0): 511 ml.
- 4.6.2. Solvente A: acetonitrile
Acetonitrile (4.2) di purezza analitica HPLC.
Degasare.
- 4.6.3. Solvente B: 0,1 ml di soluzione tampone di acetato di sodio a pH 4,66
Pesare 8,203 g di acetato di sodio (4.4), aggiungere 6,005 g di acido acetico glaciale (4.5) e portare a 1 000 ml con acqua (2) in un matraccio tarato.
5. **Preparazione dell'estratto di riferimento di *Glycyrrhiza glabra* (4.3)**
- 5.1. Pesare 10 g di legno di liquirizia (*Glycyrrhiza glabra*) macinato (4.3) e introdurli in un pallone di distillazione.
— Aggiungere 100 ml di etanolo al 50 % in vol. (4.6.1).
— Bollire a ricadere per un'ora.
— Filtrare.
— Conservare il filtrato ottenuto.
- 5.2. Recuperare dal filtro la liquirizia estratta
— Porre in un pallone di distillazione.
— Aggiungere 100 ml di etanolo al 50 % in vol. (4.6.1).
— Bollire a ricadere per un'ora.
— Filtrare. Conservare il filtrato ottenuto.
- 5.3. L'estrazione del legno di liquirizia deve essere effettuata per tre volte successive.
- 5.4. Riunire i tre filtrati.
- 5.5. Evaporare il solvente (5.4) con un evaporatore di tipo rotativo.
- 5.6. Riprendere l'estratto residuo (5.5) mediante 100 ml di etanolo al 50 % in vol. (4.6.1).
6. **Apparecchiature e materiali**
- 6.1. Sistema di separazione.
- 6.1.1. Cromatografo liquido ad alte prestazioni.
- 6.1.2. Sistema di pompaggio che permetta di ottenere e mantenere una portata costante o programmata dei solventi, con elevata precisione.
- 6.1.3. Rivelatore spettrofotometrico UV/visibile, regolabile sulle lunghezze d'onda 254 e 370 nm.
- 6.1.4. Sistema di degasaggio dei solventi.
- 6.1.5. Forno della colonna regolabile alla temperatura di 40 ± 0,1 °C.
- 6.2. Integratore calcolatore o registratore compatibili con la strumentazione disponibile.

- 6.3. Colonna:
- Materiale: acciaio inossidabile o vetro
- Diametro interno: 4-5 mm
- Fase stazionaria: silice innestata con gruppi funzionali ottadecilenici (C18), con granulometria, preferibilmente sferica, di 5 μm (fase legata).
- 6.4. Normale materiale da laboratorio, comprendente:
- 6.4.1. Bilancia analitica (precisione: $\pm 0,1$ mg).
- 6.4.2. Apparecchio di distillazione a ricadere dotato ad, esempio:
- di un pallone da 250 ml con collo smerigliato normalizzato,
 - di un refrigerante a ricadere della lunghezza di 30 cm,
 - di un dispositivo di riscaldamento (usare un dispositivo appropriato per evitare una eventuale pirolisi del materiale estrattivo).
- 6.4.3. Apparecchio di evaporazione di tipo rotativo.
- 6.4.4. Dispositivo di filtrazione (per esempio imbuto di Büchner).
- 6.5. Condizioni cromatografiche (a titolo di esempio)
- 6.5.1. Caratteristiche di eluizione dei solventi A (4.6.2) e B (4.6.3):
- gradiente da 20/80 (v/v) a 50/50 (v/v) in 15 minuti;
 - gradiente da 50/50 (v/v) a 75/25 (v/v) in 5 minuti;
 - isocratica a 75/25 (v/v) per 5 minuti;
 - stabilizzazione della colonna tra due iniezioni:
 - isocratica 20/80 (v/v) per 5 minuti.
- 6.5.2. Flusso dell'eluente: 1 ml/minuto.
- 6.5.3. Regolazione del rivelatore UV:
- il rivelatore dev'essere regolato a 370 nm per rivelare la presenza di calconi e poi a 254 nm per rivelare l'acido glicirrizico.
- Nota:* il cambiamento di lunghezza d'onda (da 370 a 254 nm) dev'essere effettuato 30 secondi prima dell'inizio del picco di eluizione dell'acido glicirrizico.

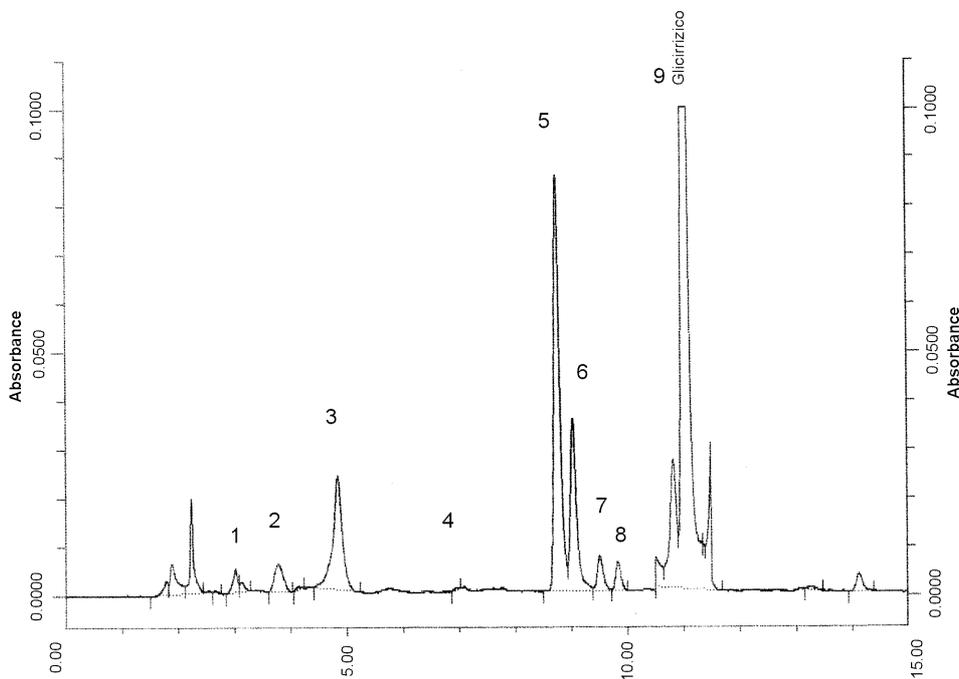
7. Procedimento

- 7.1. Preparazione del campione di bevanda spiritosa.
- Filtrare attraverso un filtro per solventi organici (diametro pori: 0,45 μm).
- 7.2. Preparazione del residuo di estratto di liquirizia (5.6).
- Preparare una diluizione 1:10 con etanolo 50 % vol (4.6.1) prima dell'analisi.
- 7.3. Determinazione
- 7.3.1. Iniettare 20 μl dell'estratto di liquirizia preparato (7.2). Effettuare l'analisi nelle condizioni cromatografiche precedentemente descritte (6.5).
- 7.3.2. Iniettare 20 μl del campione (7.1) di bevanda spiritosa all'anice. Effettuare l'analisi nelle condizioni cromatografiche precedentemente descritte (6.5).
- 7.3.3. Confrontare i due cromatogrammi. Si deve ottenere una forte rassomiglianza dei due cromatogrammi nella zona di uscita dei calconi (durante la rivelazione a 370 nm, nelle condizioni d'analisi precedentemente descritte) (cfr. figura 1).

8. **Cromatogramma per un pastis**

Figura 1

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

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

Risultati delle prove interlaboratorio:

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

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

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

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

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

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

Tipi di campione:

- A Pastis; in doppio cieco
- B Pastis; campione unico
- C Pastis; campione unico
- D «Pastis» (non contenente calconi); in doppio cieco
- E «Pastis» (non contenente calconi); in doppio cieco
- F Liquore all'anice (non contenente calconi); in doppio cieco
- G Liquore all'anice (non contenente calconi); in doppio cieco
- H Ouzo (non contenente calconi); campione unico
- I Ouzo (non contenente calconi); campione unico
- J Anice (non contenente calconi); in doppio cieco
- K «Pastis» (non contenente calconi); in doppio cieco

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

1. Campo di applicazione

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

2. Riferimenti normativi

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

3. Principio

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

4. Reagenti

- 4.1. Acqua bidistillata.
- 4.2. Farina di infusori.
- 4.3. Etanolo al 96 % (CAS 64-17-5).
- 4.4. Soluzione di acetato di magnesio al 15 % (CAS 16674-78-5).
- 4.5. Acido solforico 10 % (CAS 7664-93-9).

- 4.6. Acido solforico 1N.
- 4.7. Soluzione di diidrogenofosfato di potassio a 0,16 g/l (CAS 778-77-0), KH_2PO_4 .
- 4.8. Reattivo per la determinazione dei fosfati
Sciogliere 20 g di molibdato d'ammonio (CAS 12054-85-2), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, in 400 ml d'acqua a 50 °C.
In un altro recipiente, sciogliere 1 g di vanadato d'ammonio (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3 , in 300 ml d'acqua calda e aggiungere, dopo raffreddamento, 140 ml di acido nitrico concentrato (CAS 7697-37-2). Le soluzioni raffreddate vengono riunite in un matraccio tarato da 1 000 ml e portate a volume.

5. **Apparecchiature e materiali**

- 5.1. Beuta da 100 ml.
- 5.2. Bagno a ultrasuoni (o agitatore magnetico).
- 5.3. Matraccio tarato da 100 ml.
- 5.4. Bagnomaria a 20 °C.
- 5.5. Filtro (Whatman n. 4 o equivalente).
- 5.6. Capsula di porcellana (o di platino).
- 5.7. Bagnomaria bollente.
- 5.8. Piastra riscaldante.
- 5.9. Forno a muffola.
- 5.10. Matraccio tarato da 50 ml.
- 5.11. Matraccio tarato da 20 ml.
- 5.12. Spettrofotometro regolato a 420 nm.
- 5.13. Vaschetta da 1 cm.

6. **Campioni**

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

7. **Modo di operare**

- 7.1. Preparazione del campione
- 7.1.1. Pesare 10 g di campione in una beuta da 100 ml (5.1).
- 7.1.2. Aggiungere 70 ml di etanolo poco alla volta in piccole porzioni, miscelando dopo ogni aggiunta, e porre in un bagno a ultrasuoni (5.2) per 15 minuti, oppure agitare la miscela con un agitatore magnetico (5.2) per 10 minuti a temperatura ambiente.
- 7.1.3. Trasferire il contenuto della beuta in un matraccio tarato da 100 ml (5.3) risciacquando con etanolo (4.3). Portare a volume con etanolo (4.3) e porre i matracci in bagnomaria a 20 °C (5.4). Portare a volume a 20 °C.
- 7.1.4. Dopo l'aggiunta di una piccola quantità di farina di infusori (4.2) filtrare (5.5) scartando i primi 20 ml.
- 7.1.5. Trasferire 25 ml di filtrato in un crogiolo di porcellana (o di platino). Concentrare questo filtrato per evaporazione lenta in un bagnomaria bollente (5.7) con l'aggiunta di 5 ml di una soluzione di acetato di magnesio al 15 % (4.4).
- 7.1.6. Porre le capsule su una piastra riscaldante (5.8) e riscaldare fino ad ottenere un residuo secco.
- 7.1.7. Incenerire il residuo riscaldandolo fino a incandescenza a 600 °C in un forno a muffola (5.9) finché le ceneri sono bianche, per un tempo minimo di un'ora e mezzo, che si può protrarre anche per una notte.
- 7.1.8. Riprendere le ceneri con 10 ml di acido solforico 10 % (4.5) e trasferirle risciacquando con acqua distillata (4.1), in un matraccio tarato da 50 ml (5.10); portare a segno a temperatura ambiente, con acqua distillata (4.1). Un'aliquota di 5 ml di questa soluzione delle ceneri viene utilizzata per la determinazione fotometrica dei fosfati.
- 7.2. Determinazione fotometrica dei fosfati.
- 7.2.1. Soluzione di confronto.
- 7.2.1.1. Introdurre 10 ml di acido solforico 10 % (4.5) in un matraccio tarato da 50 ml (5.10) e riempire fino alla tacca con acqua distillata (4.1).

- 7.2.1.2. In un matraccio tarato da 20 ml (5.11), aggiungere ad un'aliquota di 5 ml di questa soluzione (7.2.1.1) 1 ml di acido solforico 1N (4.6) e 2 ml di reagente dei fosfati (4.8) e portare a 20 ml con acqua distillata (4.1).
- 7.2.1.3. Chiudere con un tappo non serrato ermeticamente, agitare e riscaldare per 10 minuti in bagnomaria bollente (5.7), poi raffreddare per 20 minuti in un bagnomaria a 20 °C (5.4).
- 7.2.1.4. Riempire una cuvetta da 1 cm (5.13) con questa soluzione di confronto.
- 7.2.2. Soluzione campione
- 7.2.2.1. In un matraccio tarato da 20 ml (5.11) aggiungere ad un'aliquota di 5 ml delle ceneri (7.1.8) 1 ml di acido solforico 1N (4.6) e 2 ml di reagente dei fosfati (4.8) e portare a 20 ml con acqua distillata (4.1).
- 7.2.2.2. Chiudere con un tappo non serrato ermeticamente, agitare e riscaldare per 10 minuti in bagnomaria bollente (5.7), poi raffreddare per 20 minuti in un bagnomaria a 20 °C (5.4).
- 7.2.2.3. La soluzione gialla formatasi viene immediatamente analizzata con uno spettrofotometro (5.12) a 420 nm in una cuvetta da 1 cm (5.13), in rapporto alla soluzione di confronto (7.2.1.4).
- 7.2.3. Curva di calibrazione
- 7.2.3.1. Per determinare la curva di calibrazione, inserire aliquote da 20 ml di reagente dei fosfati (4.8) in matracci tarati da 20 ml (5.11) contenenti ciascuno 1 ml di acido solforico 1N (4.6) e volumi rispettivamente di 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ml della soluzione di diidrogenofosfato di potassio (4.7), e portare a 20 ml con acqua distillata (4.1).
- 7.2.3.2. Chiudere con un tappo non serrato ermeticamente e riscaldare per 10 minuti in bagnomaria bollente (5.7), poi raffreddare per 20 minuti in un bagnomaria a 20 °C (5.4) ed eseguire la determinazione fotometrica (5.12) in una cuvetta da 1 cm (5.13) a 420 nm in rapporto alla soluzione di confronto (7.2.1.4).
- 7.2.3.3. Costruzione della curva di calibrazione:

soluzione di diidrogenofosfato (ml)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. Espressione dei risultati

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

$$\text{giallo d'uovo(g/l)} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{massa volumica}}{E/40}$$

dove:

110 = fattore di conversione per il P₂O₅ totale in g in 100 g di giallo d'uovo

mg P₂O₅ = valore determinato nel campione in base alla curva di calibrazione

massa volumica = massa volumica del liquore a base d'uovo a 20 °C (g/ml)

E = peso del liquore a base d'uovo, in g

40 = fattore di diluizione dell'aliquota di 5 ml di soluzione di ceneri.

9. Efficienza del metodo (precisione)

Risultati statistici delle prove interlaboratorio:

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

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

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

Tipi di campione:

- A Advocaat; in doppio cieco
- B Advocaat in doppio cieco
- C Advocaat, in doppio cieco
- D Advocaat (diluito), frazione (*)
- E Advocaat, in doppio cieco.