

**REGLAMENTO (CE) N° 2091/2002 DE LA COMISIÓN
de 26 de noviembre de 2002**

por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2870/2000 que establece métodos comunitarios de referencia para el análisis de las bebidas espirituosas

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CEE) n° 1576/89 del Consejo, de 29 de mayo de 1989, por el que se establecen las normas generales relativas a la definición, designación y presentación de las bebidas espirituosas ⁽¹⁾, modificado por el Acta de adhesión de Austria, de Finlandia y de Suecia, y, en particular, el apartado 8 de su artículo 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) n° 2870/2000 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2000, que establece métodos comunitarios de referencia para el análisis de las bebidas espirituosas ⁽²⁾, describe tales métodos en su anexo.
- (2) Según criterios reconocidos internacionalmente en el contexto de una actividad de investigación apoyada por la Comisión, se han validado cuatro métodos de análisis aplicables a la determinación de trans-anetol en las bebidas espirituosas anisadas, de ácido glicirrónico y de chalconas en los pastis, y de yema de huevo en los licores de huevo y a base de huevo.

(3) Estos cuatro métodos pueden reconocerse como métodos comunitarios de referencia y deben añadirse al anexo del Reglamento (CE) n° 2870/2000.

(4) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de aplicación de las bebidas espirituosas.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo del Reglamento (CE) n° 2870/2000 quedará modificado como sigue:

- 1) En el índice del anexo, el término «(p.m.)» se suprimirá en los capítulos V, VI, VII y IX.
- 2) Se añadirán tras el capítulo III los capítulos V, VI, VII y IX que figuran en el anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el séptimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 26 de noviembre de 2002.

Por la Comisión
Franz FISCHLER
Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO L 160 de 12.6.1989, p. 1.

⁽²⁾ DO L 333 de 29.12.2000, p. 20.

ANEXO

V. ANETOL. DETERMINACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE GASES DE TRANS-ANETOL EN BEBIDAS ESPIRITUOSAS

1. **Ámbito de aplicación**

Este método es adecuado para la determinación de trans-anetol en bebidas espirituosas anisadas mediante cromatografía capilar de gases.

2. **Referencias normativas**

ISO 3696: 1987 Agua para uso en laboratorio de análisis — Especificaciones y métodos de prueba.

3. **Principio**

La concentración de trans-anetol en la bebida espirituosa se determina por cromatografía de gases (CG). Se añade la misma cantidad de un patrón interno, por ejemplo 4-alil-anisol (estragol) si no hay estragol presente de forma natural en la muestra, tanto a la muestra problema como a una solución de referencia de trans-anetol de concentración conocida, se diluyen ambas con solución de etanol al 45 % y se inyectan directamente en el sistema de CG. Es necesario proceder a una extracción antes de la preparación de la muestra y del análisis en caso de que el licor contenga gran cantidad de azúcares.

4. **Reactivos y material**

Durante el análisis deben utilizarse exclusivamente reactivos de una pureza mínima del 98 %. El agua debe ser al menos de grado 3 según la definición de la norma ISO 3696.

Las sustancias de referencia deben conservarse refrigeradas (a unos 4 °C), protegidas de la luz, en recipientes de aluminio o en frascos de vidrio topacio. Es preferible que los tapones tengan un cierre de aluminio. Hay que fundir el trans-anetol a partir de su estado cristalino antes de utilizarlo, pero en este caso su temperatura no debe superar nunca los 35 °C.

- 4.1. Etanol al 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. 1-metoxi-4- (1-propenil) benceno (trans-anetol) (CAS 4180-23-8)
- 4.3. 4-alil-anisol (estragol) (CAS 140-67-0), patrón interno recomendado (PI)
- 4.4. Etanol al 45 % vol.

Añadir 560 g de agua destilada a 378 g de etanol al 96 % vol.

4.5. Preparación de las soluciones de patrón

Todas las soluciones de patrón deben conservarse a temperatura ambiente (15-35 °C), protegidas de la luz en recipientes de aluminio o en frascos de vidrio topacio. Es preferible que los tapones tengan un cierre de aluminio.

El trans-anetol y el 4-alil-anisol son prácticamente insolubles en agua, por lo que es necesario disolverlos en una porción de etanol al 96 % (4.1) antes de la adición de etanol al 45 % (4.4).

Las soluciones madre deben prepararse de nuevo cada semana.

4.5.1. Solución de patrón A

Solución madre de trans-anetol (concentración: 2 g/l)

Pesar 40 mg de trans-anetol (4.2) en un matraz aforado de 20 ml (o 400 mg en 200 ml, etc.). Añadir una porción de etanol al 96 % (4.1), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

4.5.2. Solución de patrón interno B

Solución madre de patrón interno, por ejemplo, estragol (concentración: 2 g/l)

Pesar 40 mg de estragol (4.3) en un matraz aforado de 20 ml (o 400 mg en 200 ml, etc.). Añadir una porción de etanol al 96 % (4.1), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

4.5.3. Soluciones utilizadas para comprobar la linealidad de la respuesta del detector de ionización de llama (DIL)

Debe comprobarse la linealidad de la respuesta del DIL en el análisis teniendo en cuenta una gama de concentraciones de trans-anetol en bebidas espirituosas entre 0 g/l y 2,5 g/l. En el procedimiento de análisis, las muestras problema de bebidas espirituosas analizadas deben diluirse 10 veces (8.3). En las condiciones del análisis descritas en el método, deben prepararse de la forma siguiente soluciones madre correspondientes a las concentraciones de 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 y 0,25 g/l de trans-anetol en la muestra analizada: tomar con pipeta 0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5 ml de solución madre A (4.5.1) y pasarlos a una serie de matraces aforados de 20 ml; pipetear en cada matraz 2 ml de solución de patrón interno B (4.5.2), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

Se utilizará como solución de 0 g/l la solución en blanco (8.4).

4.5.4. Solución de patrón C

Tomar con pipeta 2 ml de solución de patrón A (4.5.1) y pasarlos a un matraz aforado de 20 ml; añadir después 2 ml de solución de patrón interno B (4.5.2), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

5. **Aparatos y equipo**

5.1. Cromatógrafo capilar de gases equipado con un detector de ionización de llama (DIL) y un integrador u otro sistema de tratamiento de datos que pueda medir alturas o áreas de picos, así como un muestreador automático o el equipo necesario para la inyección manual de muestras.

5.2. Inyector de tipo split/splitless (con/sin fraccionamiento)

5.3. Columna capilar como, por ejemplo, la siguiente:

Longitud: 50 m,

Diámetro interno: 0,32 mm,

Espesor de capa: 0,2 µm,

Fase estacionaria: FFAP — polímero poroso de unión cruzada polietilenglicol —TPA modificado.

5.4. Material corriente de laboratorio: material de vidrio para volumetría de grado A, balanza analítica (precisión: ± 0,1 mg).

6. **Condiciones cromatográficas**

El tipo y las dimensiones de la columna, así como las condiciones de cromatografía de gases deben ser tales que el anetol y el patrón interno se separen entre sí y de las eventuales sustancias interferentes. Como condiciones típicas de la columna indicada en el punto 5.3 pueden citarse las siguientes:

6.1. Gas portador: helio de calidad analítica

6.2. Flujo: 2 ml/minuto

6.3. Temperatura del inyector: 250 °C

6.4. Temperatura del detector: 250 °C

6.5. Condiciones de temperatura del horno: isotérmica, 180 °C, tiempo de funcionamiento 10 minutos

6.6. Volumen de inyección: 1 µl, split 1:40

7. **Muestras**

Las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente, protegidas de la luz y del frío.

8. **Procedimiento**

8.1. Examen para confirmar la ausencia de estragol en la muestra

Para asegurarse de que no hay estragol presente de forma natural en la muestra, debe realizarse un análisis en blanco sin adición de patrón interno. En caso de que haya estragol presente de forma natural deberá elegirse otro patrón interno (por ejemplo, mentol).

Pipetear 2 ml de muestra en un matraz aforado de 20 ml, enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

8.2. Preparación de las muestras problema

Pipetear 2 ml de muestra en un matraz aforado de 20 ml, añadir 2 ml de solución de patrón interno B (4.5.2), enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

8.3. Blanco

Pipetear 2 ml de solución de patrón interno B (4.5.2) en un matraz aforado de 20 ml, enrasar con etanol al 45 % vol. (4.4) y mezclar bien.

8.4. Prueba de linealidad

Antes de iniciar el análisis hay que comprobar la linealidad de la respuesta del DIL, analizando por triplicado sucesivamente cada una de las soluciones de patrón para la prueba de la linealidad (4.5.3).

A partir de las alturas o las áreas de los picos, obtenidas con el integrador, representar gráficamente la concentración de su solución madre en g/l frente al valor R de cada uno.

$R = \text{altura o área del pico de trans-anetol} / \text{altura o área del pico de estragol}$

Debe obtenerse una recta.

8.5. Determinación

Inyectar la solución en blanco (8.3), seguida por la solución de patrón C (4.5.4), y después por uno de los patrones de linealidad (4.5.3) que hará de muestra de control de calidad (este puede elegirse en función de la concentración probable de trans-anetol en la muestra problema), seguido por cinco muestras problema (8.2); introducir una muestra de linealidad (control de calidad) cada cinco muestras problema, para asegurarse de la estabilidad analítica.

9. **Cálculo del factor de respuesta**

Medir las áreas de los picos (utilizando un integrador u otro sistema de datos) o bien las alturas de los picos (integración manual) correspondientes al trans-anetol y al patrón interno.

9.1. Cálculo del factor de respuesta (RF_i)

El factor de respuesta se calcula de la manera siguiente:

$$RF_i = (C_i / \text{área o altura}_i) * (\text{área o altura}_{is} / C_{is})$$

donde:

C_i es la concentración de trans-anetol en la solución de patrón A (4.5.1.)

C_{is} es la concentración de patrón interno en la solución de patrón B (4.5.2.)

área_i es el área (o altura) del pico de trans-anetol

área_{is} es el área (o altura) del pico de patrón interno

RF_i se calcula a partir de 5 muestras de solución C (4.5.4)

9.2. Análisis de las soluciones de la prueba de linealidad de la respuesta

Inyectar las soluciones de la prueba de linealidad de la respuesta (4.5.3).

9.3. Análisis de la muestra

Inyectar la solución de la muestra problema (8.2).

10. **Cálculo de los resultados**

La fórmula para calcular la concentración de trans-anetol es la siguiente:

$$c_i = C_{is} * (\text{área o altura}_i / \text{área o altura}_{is}) * RF_i$$

donde:

c_i es la concentración de trans-anetol en la muestra problema

C_{is} es la concentración de patrón interno en la muestra problema (4.5.2)

Área o altura_i es el área (o altura) del pico de trans-anetol

Área o altura_{is} es el área (o altura) del pico de patrón interno

RF_i es el coeficiente de respuesta (calculado como se indica en 9.1)

La concentración de trans-anetol se expresa en gramos por litro, con un decimal.

11. Control y garantía de calidad

Los cromatogramas deben ser tales que el anetol y el patrón interno estén separados entre sí y de las eventuales sustancias interferentes. El valor RF_i se calcula a partir de los resultados de las cinco inyecciones de solución C (4.5.4). Si el coeficiente de variación [CV % = (desviación típica/media) * 100] está comprendido entre más o menos 1 %, el valor medio de RF_i es aceptable.

Esta fórmula debe utilizarse para calcular la concentración de trans-anetol en la muestra seleccionada para el control de calidad a partir de las soluciones de control de la linealidad (4.5.3).

Si los resultados medios calculados del análisis de la solución de control de la linealidad seleccionada como muestra de control interno de calidad (CIC) están comprendidos entre más o menos 2,5 % de su valor teórico, pueden aceptarse los resultados obtenidos con las muestras problema.

12. Tratamiento previo al análisis por CG de las muestras de bebidas espirituosas que contengan grandes cantidades de azúcar y de las muestras de licor

Extracción de alcohol de una bebida espirituosa que contenga gran cantidad de azúcar, para poder determinar la concentración de trans-anetol mediante cromatografía capilar de gases.

12.1. Principio

Se toma una alícuota de la muestra de licor y se le añade el patrón interno, a una concentración similar a la del analito (trans-anetol) en el licor. También se añade después fosfato de sodio dodecahidratado y sulfato de amonio anhidro. La mezcla resultante se agita y se enfría; se forman dos capas y se retira la capa alcohólica de arriba. Se toma una alícuota de esta capa alcohólica y se diluye con solución de etanol al 45 % (4.4) (Nota: En esta etapa no se añade patrón interno porque ya se ha hecho previamente). La solución resultante se analiza en cromatografía de gases.

12.2. Reactivos y material

Durante la extracción deben utilizarse exclusivamente reactivos de pureza superior al 99 %.

12.2.1. Sulfato de amonio anhidro (CAS 7783-20-2)**12.2.2. Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado (CAS 10039-32-4)****12.3. Aparatos y equipo**

Matraces Erlenmeyer, ampollas de decantación, frigorífico.

12.4. Procedimiento**12.4.1. Examen para confirmar la ausencia de estragol en la muestra**

Para asegurarse de que no hay estragol presente de forma natural en la muestra, debe realizarse una extracción en blanco (12.6.2) y un análisis sin adición de patrón interno. En caso de que haya estragol presente de forma natural deberá elegirse otro patrón interno.

12.4.2. Extracción

Pipetear 5 ml de etanol al 96 % (4.1) en un matraz Erlenmeyer, pesar en este matraz 50 mg de patrón interno (4.3), y añadir 50 ml de la muestra. Añadir 12 g de sulfato de amonio anhidro (12.2.1), y 8,6 g de fosfato dibásico de sodio dodecahidratado (12.2.2). Tapar el matraz Erlenmeyer.

Agitar el matraz durante al menos 30 minutos. Puede utilizarse un agitador mecánico, pero no una barra de agitador magnético recubierta de teflón, ya que éste puede absorber parte del analito. Obsérvese que las sales añadidas no se disuelven por completo.

Poner el matraz tapado en un frigorífico ($T < 5^{\circ}\text{C}$) durante al menos dos horas.

Tras este tiempo debe haber dos capas líquidas separadas y un residuo sólido. La capa alcohólica debe estar clara; en caso contrario, volver a poner en el frigorífico hasta obtener una separación clara.

Una vez esté clara la capa alcohólica, tomar cuidadosamente una alícuota (por ejemplo, 10 ml), sin remover la capa acuosa, ponerla en un frasco de vidrio topacio y cerrar firmemente.

12.4.3. Preparación de la muestra extraída para el análisis

Dejar que el extracto (12.4.2) se atempere a temperatura ambiente.

Tomar 2 ml de la capa alcohólica de la muestra extraída atemperada y pasarlos con pipeta a un matraz aforado de 20 ml, enrasar con etanol al 45 % (4.4) y mezclar bien.

12.5. Determinación

Seguir el procedimiento indicado en el punto 8.5.

12.6. Cálculo de los resultados

Aplicar la fórmula siguiente para calcular los resultados:

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

donde:

m_{is} es el peso del patrón interno (4.3.) tomado (12.4.2) (en miligramos)

V es el volumen de la muestra problema (50 ml)

RF_i es el factor de respuesta (9.1)

área_i es el área del pico de trans-anetol

área_{is} es el área del pico de patrón interno

Los resultados se expresan en gramos por litro, con un decimal.

12.7. Control y garantía de calidad

Seguir el procedimiento indicado en el punto 11.

13. Características del método (precisión)

Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios:

Los cuadros siguientes recogen los valores correspondientes al anetol.

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios	1998
Número de laboratorios	16
Número de muestras	10
Analito	anetol

Pastis:

Muestras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	15	15	15	13	16	16
Número de valores anómalos (laboratorios)	1	1	1	3	—	—
Número de resultados aceptados	30	30	30	26	16	16
Valor medio g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Límite de repetibilidad (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Límite de reproducibilidad (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Tipos de muestras:

A pastis, duplicados ciegos

B pastis, duplicados ciegos

C pastis, duplicados ciegos

D pastis, duplicados ciegos

E pastis, muestra única

F pastis, muestra única

Otras bebidas espirituosas anisadas:

Muestras	G	H	I	J
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	16	14	14	14
Número de valores anómalos (laboratorios)	—	2	1	1
Número de resultados aceptados	32	28	28	28
Valor medio g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Límite de repetibilidad (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Límite de reproducibilidad (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Tipos de muestras:

G ouzo, niveles de fraccionamiento (split) (*)

H anís, duplicados ciegos

I licor anisado, duplicados

J licor anisado, duplicados

VI. ÁCIDO GLICIRRÍICO. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GLICIRRÍICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

1. **Ámbito de aplicación**

Este método es aplicable a la determinación del ácido glicirrónico en bebidas espirituosas anisadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). El Reglamento (CEE) n° 1576/89 especifica que las bebidas espirituosas anisadas denominadas «pastis» deben presentar un contenido de ácido glicirrónico comprendido entre 0,05 y 0,5 g/l.

2. **Referencias normativas**

ISO 3696: 1987 Agua para uso en laboratorio de análisis — Especificaciones y métodos de prueba.

3. **Principio**

La concentración de ácido glicirrónico se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV. Una solución patrón y la muestra problema se filtran y se inyectan por separado directamente en el sistema de CLAR.

4. **Reactivos y material**

Durante el análisis, utilizar exclusivamente reactivos de grado CLAR, etanol absoluto y agua de grado 3, según se define en la norma ISO 3696.

- 4.1. Etanol al 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Glicirricinato de amonio, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (sal amónica del ácido glicirricico)
(Peso mol.: 839,98) (CAS 53956-04-0): pureza mínima del 90 %.
(Peso mol. del ácido glicirricico: 822,94)
- 4.3. Ácido acético glacial, CH_3COOH (CAS 64-19-7)
- 4.4. Metanol, CH_3OH (CAS 67-56-1)
- 4.5. Etanol al 50 % vol.
Para 1 000 ml a 20 °C:
— etanol al 96 % vol. (4.1): 521 ml
— agua (2.0): 511 ml
- 4.6. Preparación de las soluciones de elución de CLAR
 - 4.6.1. Disolvente de elución A (ejemplo)
80 partes (en volumen) de agua (2.0)
20 partes (en volumen) de ácido acético (4.3)
Desgasificar el disolvente de elución durante cinco minutos.
Nota: Si el agua utilizada no se ha microfiltrado, es recomendable filtrar el disolvente de elución preparado a través de un filtro para disolventes orgánicos con un tamaño de poro inferior o igual a 0,45 μm .
 - 4.6.2. Disolvente de elución B
Metanol (4.4).
- 4.7. Preparación de las soluciones de patrón
Todas las soluciones de patrón deben prepararse de nuevo al cabo de dos meses.
 - 4.7.1. Solución de referencia C
Pesar, con precisión de 0,1 mg, 25 mg de glicirricinato de amonio (4.2) en un matraz aforado de 100 ml. Añadir una porción de etanol al 50 % vol. (4.5) y disolver el glicirricinato de amonio. Una vez disuelto, enrasar con etanol al 50 % (4.5).
Filtrar a través de filtro para disolventes orgánicos.
 - 4.7.2. Soluciones de patrón utilizadas para comprobar la linealidad de la respuesta del instrumental
Preparar un solución madre de 1,0 g/l pesando, con precisión de 0,1 mg, 100 mg de glicirricinato de amonio en un matraz aforado de 100 mL. Añadir una porción de etanol al 50 % vol. (4.5) y disolver el glicirricinato de amonio. Una vez disuelto, enrasar con etanol al 50 % (4.5).
Preparar al menos otras cuatro soluciones correspondientes a 0,05, 0,1, 0,25 y 0,5 g/l de glicirricinato de amonio pipeteando respectivamente 5 ml, 10 ml, 25 ml y 50 ml de la solución madre de 1,0 g/l en sendos matraces aforados de 100 ml. Enrasar con etanol al 50 % vol. (4.5) y mezclar bien.
Filtrar todas las soluciones a través de un filtro para disolventes orgánicos.
5. **Aparatos y equipo**
 - 5.1. Sistema de separación
 - 5.1.1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución
 - 5.1.2. Sistema de bombeo que permita conseguir y mantener un flujo constante o programado con gran precisión.
 - 5.1.3. Sistema de detección espectrofotométrico UV que se regule a 254 nm.
 - 5.1.4. Sistema de desgasificación del disolvente
 - 5.2. Registrador o integrador informatizado, de prestaciones compatibles con el resto de los aparatos.

- 5.3. Columna (ejemplo):
Material: acero inoxidable o vidrio
Diámetro interno: de 4 a 5 mm
Longitud: de 100 a 250 mm
Fase estacionaria: sílice con enlaces cruzados con un grupo funcional octadecilo (C18), preferentemente esférico, con granulometría de 5 µm como máximo.
- 5.4. Equipo de laboratorio
- 5.4.1. Balanza analítica con precisión de 0,1 mg
- 5.4.2. Material aforado de vidrio de clase A
- 5.4.3. Dispositivo de filtración por micromembrana para pequeños volúmenes

6. Condiciones cromatográficas

- 6.1. Características de elución (ejemplo):
— flujo: 1 ml/minuto,
— disolvente A = 30 %,
— disolvente B = 70 %.
- 6.2. Detección:
— UV = 254 nm

7. Procedimiento

- 7.1. Preparación de la muestra de licor
Filtrar, si es necesario, a través de filtro para disolventes orgánicos (diámetro de poro: 0,45 µm).
- 7.2. Determinación
Una vez estabilizadas las condiciones de cromatografía:
— inyectar 20 µl de la solución de referencia C (4.7.1),
— inyectar 20 µl de la solución de muestra,
— comparar los dos cromatogramas. Identificar los picos del ácido glicirrónico por su tiempo de retención. Medir sus áreas (o sus alturas) para calcular la concentración en g/l con dos decimales mediante la ecuación siguiente:

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

donde:

- c es la concentración en gramos por litro de ácido glicirrónico en la bebida espirituosa analizada
C es la concentración en gramos por litro de glicirricinato de amonio en la solución de referencia
h es el área (o la altura) del pico de ácido glicirrónico de la bebida espirituosa analizada
H es el área (o la altura) del pico de ácido glicirrónico de la solución de referencia
P es la pureza del glicirricinato de amonio de referencia (en %)
823 es la masa molar del ácido glicirrónico
840 es la masa molar del glicirricinato de amonio.

8. Características del método (precisión)

Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios:
El cuadro siguiente recoge los valores correspondientes al ácido glicirrónico.

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios 1998
 Número de laboratorios 16
 Número de muestras 5
 Analito ácido glicirrónico

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	13	14	15	16	16
Número de valores anómalos (laboratorios)	3	2	1	—	—
Número de resultados aceptados	26	28	30	32	32
Valor medio g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Límite de repetibilidad (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Límite de reproducibilidad (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Tipos de muestras:

- A pastis, duplicados ciegos
- B pastis, niveles de fraccionamiento (split) (*)
- C pastis, duplicados ciegos
- D pastis, duplicados ciegos
- E pastis, duplicados ciegos

VII. CHALCONAS. MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DE CHALCONAS EN PASTIS

1. **Ámbito de aplicación**

Este método es adecuado para determinar si hay chalconas presentes en bebidas anisadas. Las chalconas son colorantes naturales de la familia de los flavonoides que se encuentran en la raíz de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*).

Para que una bebida espirituosa anisada se denomine «pastis» debe contener chalconas [Reglamento (CEE) nº 1576/89].

2. **Referencias normativas**

ISO 3696: 1987 Agua para uso en laboratorio de análisis — Especificaciones y métodos de prueba.

3. **Principio**

Se prepara una solución de extracto de regaliz de referencia. La presencia o ausencia de chalconas se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV.

4. **Reactivos y material**

Durante el análisis, utilizar exclusivamente reactivos de clase CLAR. El etanol debe ser de 96 % vol. Sólo debe utilizarse agua de grado 3 según la definición de la norma ISO 3696.

- 4.1. Etanol al 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Acetonitrilo, CH_3CN (CAS 75-05-8)

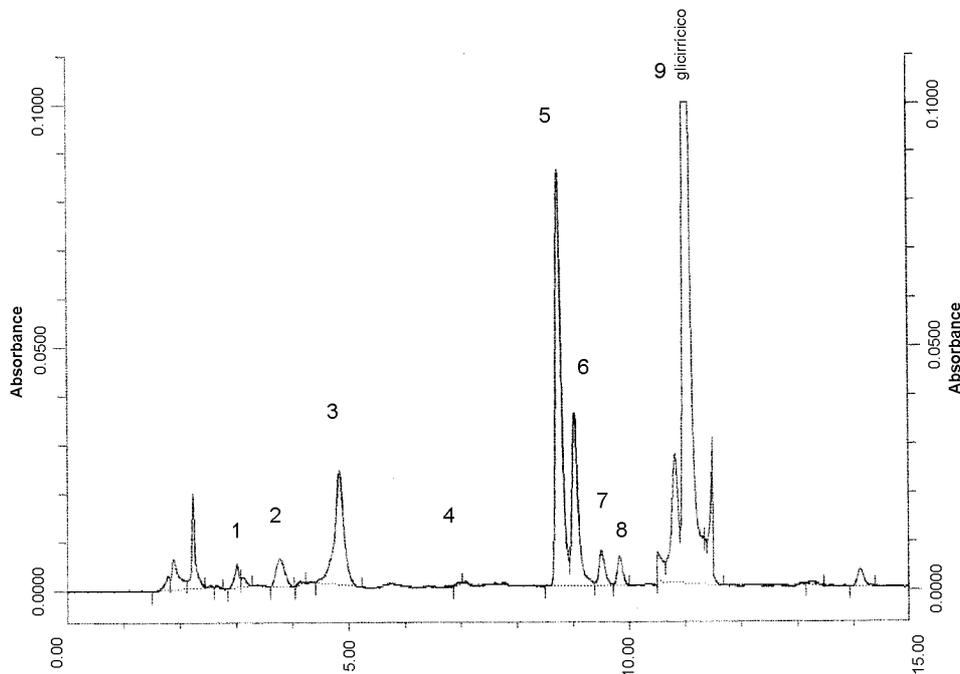
- 4.3. Sustancia de referencia: *Glycyrrhiza glabra* (regaliz)
Raíces de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) algo trituradas. Dimensiones medias de las partículas alargadas: 10-15 mm de longitud; 1-3 mm de grosor.
- 4.4. Acetato de sodio, CH₃COONa (CAS 127-09-3)
- 4.5. Ácido acético glacial, CH₃COOH (CAS 64-19-7)
- 4.6. Preparación de las soluciones
- 4.6.1. Etanol al 50 % vol.
Para 1 000 ml a 20 °C:
— etanol al 96 % vol. (4.1): 521 ml
— agua (2.0): 511 ml
- 4.6.2. Disolvente A: acetonitrilo
Acetonitrilo (4.2) de pureza analítica CLAR.
Desgasificar
- 4.6.3. Disolvente B: solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1M, pH 4,66
Pesar 8,203 g de acetato de sodio (4.4), añadir 6,005 g de ácido acético glacial (4.5) y enrasar a 1 000 ml con agua (2) en un matraz aforado.
5. **Preparación del extracto de referencia de *glycyrrhiza glabra* (4.3)**
- 5.1. Pesar 10 g de raíz triturada de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) y ponerlos en un matraz de destilación de fondo redondo.
— Añadir 100 ml de etanol al 50 % vol. (4.6.1).
— Tener en ebullición a reflujo durante una hora.
— Filtrar.
— Reservar el filtrado para su uso posterior.
- 5.2. Recuperar el extracto de regaliz del filtro
— Poner en un matraz de destilación de fondo redondo.
— Añadir 100 ml de etanol al 50 % vol. (4.6.1).
— Tener en ebullición a reflujo durante una hora.
— Filtrar. Reservar el filtrado para su uso posterior.
- 5.3. La extracción de raíz de regaliz debe realizarse tres veces sucesivamente.
- 5.4. Reunir los tres filtrados.
- 5.5. Evaporar la fase de disolvente (de 5.4) en un evaporador giratorio.
- 5.6. Recoger el extracto residual (de 5.5) con 100 ml de etanol al 50 % vol. (4.6.1).
6. **Aparatos y equipo**
- 6.1. Sistema de separación
- 6.1.1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución
- 6.1.2. Sistema de bombeo que permita conseguir y mantener un flujo constante o programado a presión elevada.
- 6.1.3. Sistema de detección espectrofotométrico UV/visible que pueda regularse a 254 y 370 nm.
- 6.1.4. Sistema de desgasificación del disolvente
- 6.1.5. Estufa de columna que pueda regularse a la temperatura de 40 ± 0,1 °C.
- 6.2. Registrador o integrador informatizado, de prestaciones compatibles con el resto del sistema de separación.

- 6.3. Columna
- Material: acero inoxidable o vidrio
- Diámetro interno: de 4 a 5 mm
- Fase estacionaria: sílice con enlaces cruzados con un grupo funcional derivado del octadecilo (C18), con granulometría de 5 µm como máximo (fase de enlaces cruzados).
- 6.4. Material corriente de laboratorio, incluido el siguiente:
- 6.4.1. Balanza analítica (precisión: ± 0,1 mg).
- 6.4.2. Aparato de destilación con condensador de reflujo con, por ejemplo, los siguientes elementos:
- un matraz de fondo redondo de 250 ml con cuello esmerilado normalizado,
 - un condensador de reflujo de 30 cm de longitud, y
 - una fuente de calor (debe evitarse toda reacción pirógena que afecte al material extractivo, mediante el uso de un dispositivo adecuado).
- 6.4.3. Aparato de evaporación giratorio.
- 6.4.4. Dispositivo de filtración (por ejemplo, embudo Buchner)
- 6.5. Condiciones de cromatografía (ejemplo)
- 6.5.1. Características de elución de los disolventes A (4.6.2) y B (4.6.3):
- pasar de 20/80 (v/v) a 50/50 (v/v) uniformemente a lo largo de quince minutos,
 - pasar de 50/50 (v/v) a 75/25 (v/v) uniformemente a lo largo de cinco minutos,
 - mantener la composición en 75/25 (v/v) durante cinco minutos,
 - estabilización de la columna entre inyecciones,
 - mantener la composición en 20/80 (v/v) durante cinco minutos.
- 6.5.2. Flujo: 1 ml/minuto
- 6.5.3. Regulación del detector de UV:
- El detector debe regularse a 370 nm para detectar la presencia de chalconas y después a 254 nm para detectar el ácido glicirrónico.
- Nota:* El cambio de longitud de onda (de 370 nm a 254 nm) debe realizarse 30 segundos antes del inicio del pico de elución del ácido glicirrónico.
7. **Procedimiento**
- 7.1. Preparación de la muestra de licor
- Filtrar a través de filtro para disolventes orgánicos (diámetro de poro: 0,45 µm).
- 7.2. Preparación del extracto residual de regaliz (5.6)
- Hacer una dilución 1:10 con etanol al 50 % vol. (4.6.1) antes del análisis.
- 7.3. Determinación
- 7.3.1. Inyectar 20 µl del extracto preparado de regaliz (7.2). Efectuar el análisis utilizando las condiciones de cromatografía descritas anteriormente (6.5).
- 7.3.2. Inyectar 20 µl de la muestra (7.1) (muestra de bebida espirituosa anisada). Efectuar el análisis utilizando las condiciones de cromatografía descritas anteriormente (6.5).
- 7.3.3. Comparar los dos cromatogramas. Debe observarse una gran similitud entre los dos cromatogramas en la zona de salida de la chalcona (durante la detección a 370 nm en las condiciones analíticas descritas anteriormente) (véase la figura 1).

8. **Cromatograma característico de un pastis**

Figura 1

Cromatograma obtenido mediante el método descrito anteriormente y que muestra la presencia de chalconas en un pastis. Los picos 1 a 8 son de chalconas y el pico 9 es de ácido glicirrónico.

9. **Características del método (precisión)**

Resultados del estudio interlaboratorios:

El cuadro siguiente recoge las características de reconocimiento de la presencia o ausencia de chalconas en pastis y bebidas espirituosas anisadas.

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios	1998
Número de laboratorios	14
Número de muestras	11
Analitos	chalconas

Muestras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	14	14	14	14	14	13
Número de valores anómalos (laboratorios)	—	—	—	—	—	1 (*)
Número de resultados aceptados	28	14	14	28	28	26
Número de resultados de presencia de chalconas	28	14	14	0	28	0
Número de resultados de ausencia de chalconas	0	0	0	28	0	26
Porcentaje de resultados correctos (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Resultados incoherentes entre los dos duplicados, atribuidos a un error de muestreo.

Muestras	G	H	I	J	K
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	14	14	14	14	14
Número de valores anómalos (laboratorios)	—	—	—	—	—
Número de resultados aceptados	28	14	14	28	28
Número de resultados de presencia de chalconas	0	0	0	0	0
Número de resultados de ausencia de chalconas	28	14	14	28	28
Porcentaje de resultados correctos (%)	100	100	100	100	100

Tipos de muestras:

- A pastis, duplicados ciegos
- B pastis, muestra única
- C pastis, muestra única
- D «pastis» (sin chalconas), duplicados ciegos
- E «pastis» (sin chalconas), duplicados ciegos
- F licor anisado (sin chalconas), duplicados ciegos
- G licor anisado (sin chalconas), duplicados ciegos
- H ouzo (sin chalconas), muestra única
- I ouzo (sin chalconas), muestra única
- J anís (sin chalconas), duplicados ciegos
- K «pastis» (sin chalconas), duplicados ciegos

IX. YEMA DE HUEVO. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE YEMA DE HUEVO EN LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS — MÉTODO FOTOMÉTRICO

1. **Ámbito de aplicación**

Este método es adecuado para la determinación de la concentración de yema de huevo en la gama de 40-250 g/l en licores de huevo y en licores a base de huevo.

2. **Referencias normativas**

ISO 3696: 1987 Agua para uso en laboratorio de análisis — Especificaciones y métodos de prueba.

3. **Principio**

Los compuestos fosforados solubles en etanol que se encuentran en la yema de huevo se extraen y se estudian por fotometría en forma de complejo de molibdato de fósforo.

4. **Reactivos y material**

- 4.1. Agua bidestilada
- 4.2. Tierra de diatomeas
- 4.3. Etanol al 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.4. Solución de acetato de magnesio al 15 % (CAS 16674-78-5)
- 4.5. Ácido sulfúrico al 10 % (CAS 7664-93-9)

- 4.6. Ácido sulfúrico 1 N
- 4.7. Solución de fosfato diácido de potasio, KH_2PO_4 , de 0,16 g/l (CAS 778-77-0)
- 4.8. Reactivo para la determinación de fosfatos:
Disolver 20 g de molibdato de amonio (CAS 12054-85-2), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 400 ml de agua a 50 °C.
Disolver, en otro recipiente, 1 g de vanadato de amonio (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3 , en 300 ml de agua caliente, dejar enfriar y añadir después 140 ml de ácido nítrico concentrado (CAS 7697-37-2). Reunir las soluciones enfriadas en un matraz aforado de 1 000 ml y enrasar.

5. Aparatos y equipo

- 5.1. Matraz Erlenmeyer de 100 ml
- 5.2. Baño de ultrasonidos (o agitador magnético)
- 5.3. Matraz aforado de 100 ml
- 5.4. Baño María a 20 °C
- 5.5. Filtro (Whatman nº 4 o equivalente)
- 5.6. Crisol de porcelana (o platino)
- 5.7. Baño María en ebullición
- 5.8. Placa de calefacción
- 5.9. Horno de mufla
- 5.10. Matraz aforado de 50 ml
- 5.11. Matraz aforado de 20 ml
- 5.12. Espectrofotómetro regulado a 420 nm
- 5.13. Cubeta de 1 cm.

6. Muestras

Antes del análisis, las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente.

7. Procedimiento

- 7.1. Preparación de la muestra
 - 7.1.1. Pesar 10 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 100 ml (5.1).
 - 7.1.2. Añadir gradualmente 70 ml de etanol (4.3) en pequeñas porciones, agitando por rotación tras cada adición, y poner en baño de ultrasonidos (5.2) durante quince minutos [o agitar la mezcla con un agitador magnético (5.2) durante diez minutos a temperatura ambiente].
 - 7.1.3. Pasar el contenido del matraz a un matraz aforado de 100 ml (5.3) lavando con etanol (4.3). Enrasar con etanol (4.3) y poner los matraces en el baño María a 20 °C (5.4). Enrasar a 20 °C.
 - 7.1.4. Añadir una pequeña cantidad de tierra de diatomeas (4.2) y filtrar (5.5), desechando los primeros 20 ml.
 - 7.1.5. Pasar 25 ml del filtrado a un crisol de porcelana (o platino) (5.6). Concentrar el filtrado evaporando delicadamente en un baño María en ebullición (5.7), con adición de 5 ml de solución de acetato de magnesio al 15 % (4.4).
 - 7.1.6. Poner los crisoles en una placa de calefacción (5.8) y calentar justo hasta sequedad.
 - 7.1.7. Incinerar el residuo calentando a incandescencia a 600 °C en un horno mufla (5.9) hasta que la ceniza sea blanca; el tiempo de calentamiento mínimo es de una hora y media, pero puede calentarse toda una noche.
 - 7.1.8. Recoger la ceniza con 10 ml de ácido sulfúrico al 10 % (4.5), pasarla, lavando con agua destilada (4.1) a un matraz aforado de 50 ml (5.10) y enrasar a temperatura ambiente con agua destilada (4.1). Debe utilizarse una alícuota de 5 ml de esta solución de cenizas a fin de preparar la solución de muestra para la determinación fotométrica del fosfato.
- 7.2. Determinación fotométrica del fosfato
 - 7.2.1. Solución de contraste
 - 7.2.1.1. Poner 10 ml de ácido sulfúrico al 10 % (4.5) en un matraz aforado de 50 ml (5.10) y enrasar con agua destilada (4.1).

- 7.2.1.2. A una alícuota de 5 ml de esta solución (7.2.1.1), puesta en un matraz aforado de 20 ml (5.11), añadir 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) y 2 ml del reactivo de fosfato (4.8), y enrasar con agua destilada (4.1).
- 7.2.1.3. Tapar con tapón poco ajustado, agitar y calentar en baño María en ebullición (5.7) durante diez minutos; enfriar a continuación en baño María a 20 °C (5.4) durante veinte minutos.
- 7.2.1.4. Llenar una cubeta de 1 cm (5.13) con esta solución de contraste.
- 7.2.2. Solución de muestra
- 7.2.2.1. A una alícuota de 5 ml de la solución de cenizas (7.1.8), puesta en un matraz aforado de 20 ml (5.11), añadir 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) y 2 ml del reactivo de fosfato (4.8), y enrasar con agua destilada (4.1).
- 7.2.2.2. Tapar con tapón poco ajustado, agitar y calentar en baño María en ebullición (5.7) durante diez minutos; enfriar a continuación en baño María a 20 °C (5.4) durante veinte minutos.
- 7.2.2.3. La solución amarilla que se forma se analiza inmediatamente por espectrofotometría (5.12) en una cubeta de 1 cm (5.13) a 420 nm frente a la solución de contraste (7.2.1.4).
- 7.2.3. Curva de calibración
- 7.2.3.1. Para construir la curva de calibración, añadir alícuotas de 2 ml del reactivo de fosfato (4.8) a una serie de matraces aforados de 20 ml (5.11), de los que cada uno contiene 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) y 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ml de solución de fosfato diácido de potasio (4.7), respectivamente, y enrasar con agua destilada (4.1).
- 7.2.3.2. Tapar con tapón poco ajustado, agitar y calentar en baño María en ebullición (5.7) durante diez minutos; enfriar a continuación en baño María a 20 °C (5.4) durante veinte minutos. Analizar por espectrofotometría (5.12) en cubeta de 1 cm (5.13) a 420 nm frente a la solución de contraste (7.2.1.4).
- 7.2.3.3. Construcción de la curva de calibración:

Solución de fosfato diácido (mL)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. Expresión de los resultados

El contenido de yema de huevo en g/l se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{g/l yema de huevo} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{densidad}}{E/40}$$

donde:

- 110 es el factor de conversión correspondiente al P₂O₅ total en g por 100 g de yema de huevo
- mg P₂O₅ es el valor establecido a partir de la curva de calibración
- densidad es la masa por unidad de volumen (g/ml) del licor a base de huevo a 20 °C
- E es el peso del licor a base de huevo en g
- 40 es el factor de dilución correspondiente a una alícuota de 5 ml de solución de cenizas.

9. Características del método (precisión)

Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios:

El cuadro siguiente recoge los valores correspondientes a la yema de huevo.

Los datos que se presentan a continuación se obtuvieron mediante un estudio internacional del método llevado a cabo con arreglo a procedimientos internacionalmente reconocidos.

Año del estudio interlaboratorios	1998
Número de laboratorios	24
Número de muestras	5
Analito:	Yema de huevo

Muestras	A	B	C	D	E
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	19	20	22	20	22
Número de valores anómalos (laboratorios)	3	4	2	4	2
Número de resultados aceptados	38	40	44	40	44
Valor medio	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Desviación típica de la repetibilidad (S_p) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Desviación típica relativa de la repetibilidad (RSD_p) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Límite de repetibilidad (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Desviación típica relativa de la reproducibilidad (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Límite de reproducibilidad (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Tipos de muestras:

- A Advocaat, duplicados ciegos
- B Advocaat, duplicados ciegos
- C Advocaat, duplicados ciegos
- D Advocaat (diluido), niveles de fraccionamiento (split) (*)
- E Advocaat, duplicados ciegos