

REGULAMENTO (CE) N.º 2091/2002 DA COMISSÃO
de 26 de Novembro de 2002
que altera o Regulamento (CE) n.º 2870/2000 que estabelece métodos de análise comunitários de
referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CEE) n.º 1576/89 do Conselho, de 29 de Maio de 1989, que estabelece as regras gerais relativas à definição, à designação e à apresentação das bebidas espirituosas ⁽¹⁾, com a redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão da Áustria, da Finlândia e da Suécia, e, nomeadamente, o n.º 8 do seu artigo 4.º,

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CE) n.º 2870/2000 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2000, que estabelece métodos de análise comunitários de referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas ⁽²⁾, descreve os métodos em causa no seu anexo.
- (2) No âmbito de um projecto de investigação apoiado pela Comissão, foram validados de acordo com procedimentos reconhecidos internacionalmente quatro métodos de análise, aplicáveis à determinação do trans-anetole em bebidas espirituosas anisadas, do ácido glicirrízico e de calconas em *pastís* e da gema de ovo em licores de ovos ou à base de ovos.

(3) Esses quatro métodos podem ser reconhecidos como métodos comunitários de referência, devendo ser incluídos no anexo do Regulamento (CE) n.º 2870/2000.

(4) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Execução para as Bebidas Espirituosas,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O anexo do Regulamento (CE) n.º 2870/2000 é alterado do seguinte modo:

1. No resumo introdutório do anexo, «(p.m.)» é suprimido nos pontos V, VI, VII e IX.
2. São aditados a seguir ao capítulo III os capítulos V, VI, VII e IX constantes do anexo do presente regulamento.

Artigo 2.º

O presente regulamento entra em vigor no sétimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e directamente aplicável em todos os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 26 de Novembro de 2002.

Pela Comissão
Franz FISCHLER
Membro da Comissão

⁽¹⁾ JO L 160 de 12.6.1989, p. 1.

⁽²⁾ JO L 333 de 29.12.2000, p. 20.

ANEXO

**V. ANETOLE. DETERMINAÇÃO DO TRANS-ANETOLE EM BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR CROMATO-
GRAFIA EM FASE GASOSA****1. Âmbito**

Este método é adequado para a determinação do trans-anetole em bebidas espirituosas anisadas por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar.

2. Referências normativas

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

3. Princípio

Determinação da concentração de trans-anetole na bebida espirituosa por cromatografia em fase gasosa. Adição da mesma quantidade de um padrão interno — por exemplo 4-alilanol (estragol), se não estiver naturalmente presente na amostra — à toma para análise e a uma solução de referência de trans-anetole de concentração conhecida e diluição de ambas com uma solução a 45 % de etanol; injeção directa de ambas no sistema de cromatografia em fase gasosa. No caso dos licores com teor de açúcares elevado, é necessária uma extracção antes da preparação e análise da amostra.

4. Material e reagentes

O grau de pureza mínimo dos reagentes a utilizar nas análises é de 98 %. Utilizar exclusivamente água de grau não inferior a 3 (escala da norma ISO 3696).

Os produtos químicos de referência serão conservados no frio (cerca de 4 °C), ao abrigo da luz, em recipientes de alumínio ou garrafas de reagentes de vidro ambarizado. As tampas devem, de preferência, ser dotadas de uma vedação de alumínio. Se o trans-anetole se encontrar no estado cristalino, será necessário liquefazê-lo antes de o utilizar, mas sem que a temperatura exceda 35 °C.

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

4.2. 1-metoxi-4-(1-propenil) benzeno (trans-anetole) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-alilanol (estragol) (CAS 140-67-0), padrão interno sugerido

4.4. Etanol a 45 % vol.

Adicionar 560 g de água destilada a 378 g de etanol a 96 % vol.

4.5. Preparação das soluções-padrão

Todas as soluções-padrão serão conservadas à temperatura ambiente (15 °C-35 °C), ao abrigo da luz, em recipientes de alumínio ou garrafas de reagentes de vidro ambarizado. As tampas devem, de preferência, ser dotadas de uma vedação de alumínio.

O trans-anetole e o 4-alilanol são praticamente insolúveis em água, pelo que é necessário dissolvê-los numa pequena quantidade de etanol a 96 % vol. (4.1) antes de adicionar o etanol a 45 % vol (4.4).

As soluções de reserva devem ser preparadas de fresco todas as semanas.

4.5.1. Solução-padrão A

Solução de reserva de trans-anetole (concentração: 2 g/l)

Pesar 40 mg de trans-anetole (4.2) num balão volumétrico de 20 ml (ou 400 mg num balão de 200 ml, etc.). Juntar uma pequena quantidade de etanol a 96 % vol. (4.1), completar o volume com etanol a 45 % vol (4.4) e homogeneizar bem.

4.5.2. Solução do padrão interno, B

Solução de reserva do padrão interno, por exemplo estragol (concentração: 2 g/l)

Pesar 40 mg de estragol (4.3) num balão volumétrico de 20 ml (ou 400 mg num balão de 200 ml, etc.). Juntar uma pequena quantidade de etanol a 96 % vol (4.1), completar o volume com etanol a 45 % vol (4.4) e homogeneizar bem.

4.5.3. Soluções utilizadas para verificar a linearidade de resposta do detector de ionização de chama

É necessário verificar a linearidade de resposta do detector de ionização de chama na análise para uma gama de concentrações de trans-anetole em bebidas espirituosas compreendida entre 0 g/l e 2,5 g/l. Na análise, as amostras de teor desconhecido de bebidas espirituosas a analisar devem ser diluídas dez vezes (8.3). Para as condições analíticas descritas no método, preparam-se como segue soluções de reserva correspondentes às concentrações de 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 e 0,25 g/l de trans-anetole na amostra a analisar: pipetar 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5 ml da solução de reserva A (4.5.1) para uma série de balões volumétricos de 20 ml; pipetar para cada balão 2 ml da solução do padrão interno, B (4.5.2), completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

Para solução de concentração 0 g/l é utilizado o branco (8.4).

4.5.4. Solução-padrão C

Pipetar 2 ml da solução-padrão A (4.5.1) para um balão volumétrico de 20 ml, adicionar 2 ml da solução do padrão interno, B (4.5.2), completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

5. **Aparelhagem e equipamento**

5.1. Cromatógrafo de fase gasosa de coluna capilar equipado com um detector de ionização de chama e um integrador ou outro sistema de tratamento de dados para a medição das áreas ou alturas dos picos e um amostrador automático ou os dispositivos necessários para a injeção manual das amostras.

5.2. Injetor com/sem divisor da amostra (*split/splitless*)

5.3. Coluna capilar, por exemplo:

Comprimento: 50 m

Diâmetro interno: 0,32 mm

Espessura do filme: 0,2 µm

Fase estacionária: FFAP — polímero poroso reticulado de ácido tereftálico e polietilenoglicol, modificado

5.4. Material corrente de laboratório: material de vidro volumétrico da classe A, balança analítica (precisão: ± 0,1 mg).

6. **Condições cromatográficas**

O tipo e dimensões da coluna e as condições cromatográficas em fase gasosa devem permitir separar o anetole do padrão interno e ambos das substâncias interferentes eventualmente presentes. Condições típicas da coluna indicada como exemplo (5.3):

6.1. Gás vector: hélio *pro analyse*

6.2. Caudal: 2 ml/minuto

6.3. Temperatura no injector: 250 °C

6.4. Temperatura no detector: 250 °C

6.5. Condições de temperatura da fornalha: isotérmica a 180 °C; tempo de funcionamento: 10 minutos.

6.6. Volume injectado: 1 µl, com divisão (*split*) de 1:40

7. **Amostras**

As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e de baixas temperaturas.

8. **Técnica**

8.1. Pesquisa de estragol na amostra

Para garantir que o estragol não está naturalmente presente na amostra, proceder-se-á a uma análise em branco, sem adição do padrão interno. Se o estragol estiver naturalmente presente, será necessário escolher outro padrão interno (por exemplo mentol).

Pipetar 2 ml da amostra para um balão volumétrico de 20 ml, completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

8.2. Preparação das amostras de teor desconhecido

Pipetar 2 ml da amostra para um balão volumétrico de 20 ml, adicionar 2 ml da solução do padrão interno, B (4.5.2), completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

8.3. Branco

Pipetar 2 ml da solução do padrão interno, B (4.5.2), para um balão volumétrico de 20 ml, completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

8.4. Teste de linearidade

Antes de iniciar as análises, é necessário confirmar a linearidade de resposta do detector de ionização de chama, analisando, para o efeito, em triplicado, cada solução-padrão de verificação da linearidade (4.5.3).

Com base nas áreas ou alturas dos picos obtidas pelo integrador para cada injeção, representar graficamente a concentração da solução-mãe respectiva, em g/l, em função da relação R correspondente.

$R = \text{altura ou área do pico do trans-anetole} / \text{altura ou área do pico do estragol}$.

Deve ser obtido um traçado linear.

8.5. Determinação

Injectar sucessivamente o branco (8.3), a solução-padrão C (4.5.4), um dos padrões de verificação da linearidade (4.5.3), que agirá como amostra de controlo de qualidade (a escolher em função da concentração provável de trans-anetole na amostra de teor desconhecido), e cinco amostras de teor desconhecido (8.2). Para garantir estabilidade analítica, injectar uma amostra de verificação da linearidade (controlo de qualidade) após cada conjunto de cinco amostras de teor desconhecido.

9. Cálculo do factor de resposta

Medir as áreas (com um integrador ou outro sistema de tratamento de dados) ou as alturas (por integração manual) dos picos do trans-anetole e do padrão interno.

9.1. Cálculo do factor de resposta (RF_i)

O factor de resposta é calculado do seguinte modo:

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

Em que:

C_i é a concentração de trans-anetole na solução-padrão A (4.5.1)

C_{pi} é a concentração de padrão interno na solução B (4.5.2)

área_i é a área (ou altura) do pico do trans-anetole

área_{pi} é a área (ou altura) do pico do padrão interno

O RF_i é calculado a partir das cinco amostras de solução C (4.5.4).

9.2. Análise das soluções de verificação da linearidade de resposta

Injectar as soluções de verificação da linearidade de resposta (4.5.3).

9.3. Análise da amostra

Injectar a amostra de teor desconhecido (8.2).

10. Cálculo dos resultados

A fórmula de cálculo da concentração de trans-anetole é a seguinte:

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

Em que:

c_i é a concentração desconhecida de trans-anetole

C_{pi} é a concentração de padrão interno na amostra de teor desconhecido (4.5.2)

área ou altura_i é a área (ou altura) do pico do trans-anetole

$\text{área ou altura}_{pi}$ é a área (ou altura) do pico do padrão interno

RF_i é o factor de resposta (calculado conforme indicado em 9.1)

A concentração de trans-anetole é expressa em grama por litro, com uma casa decimal.

11. Garantia de qualidade e controlo de qualidade

Os cromatogramas devem evidenciar a separação do anetole e do padrão interno entre si e de ambos de qualquer substância interferente. O valor de RF_i é calculado a partir dos resultados das cinco injeções de solução C (4.5.4). Se o coeficiente de variação [$CV (\%) = \text{desvio padrão}/\text{média} \cdot 100$] não exceder mais ou menos 1 %, o valor médio de RF_i será aceitável.

O cálculo anterior será utilizado para determinar a concentração de trans-anetole na amostra seleccionada para o controlo de qualidade entre as soluções de verificação da linearidade (4.5.3).

Se os resultados médios calculados a partir da análise da solução de verificação da linearidade seleccionada para amostra de controlo de qualidade interno não se afastarem mais ou menos 2,5 % do valor teórico respectivo, os resultados obtidos para as amostras de teor desconhecido serão aceitáveis.

12. Tratamento de amostras de bebidas espirituosas com teores de açúcares elevados e de amostras de licores antes da análise por cromatografia em fase gasosa

Extracção do álcool da bebida espirituosa com teor de açúcares elevado, para possibilitar a determinação da concentração de trans-anetole por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar.

12.1. Princípio

Toma-se uma alíquota da amostra de licor e adiciona-se-lhe o padrão interno, de modo a obter uma concentração semelhante à do analito (trans-anetole) no licor. Adiciona-se em seguida fosfato de sódio dodeca-hidratado e sulfato de amónio anidro. Agita-se bem a mistura resultante, arrefece-se, obtém-se a separação de duas fases e retira-se a fase (alcoólica) superior. Toma-se uma alíquota da fase alcoólica e dilui-se com solução de etanol a 45 % vol. (4.4) (nota: neste caso, não se adiciona padrão interno, por já ter sido anteriormente adicionado). Analisa-se a solução resultante por cromatografia em fase gasosa.

12.2. Material e reagentes

O grau de pureza mínimo dos reagentes a utilizar na extracção é de 99 %.

12.2.1. Sulfato de amónio anidro (CAS 7783-20-2)**12.2.2. Fosfato dibásico de sódio dodeca-hidratado (CAS 10039-32-4)****12.3. Aparelhagem e equipamento**

Erlenmeyers, ampolas de decantação, frigorífico.

12.4. Técnica**12.4.1. Pesquisa de estragol na amostra**

Para garantir que o estragol não está naturalmente presente na amostra, proceder-se-á a uma extracção em branco (12.6.2) e a análise será efectuada sem adição do padrão interno. Se o estragol estiver naturalmente presente, será necessário escolher outro padrão interno.

12.4.2. Extracção

Pipetar 5 ml de etanol a 96 % vol. (4.1) para um *erlenmeyer* e adicionar 50 mg do padrão interno (4.3), pesados no *erlenmeyer*, e 50 ml de amostra. Adicionar 12 g de sulfato de amónio anidro (12.2.1) e 8,6 g de fosfato dibásico de sódio dodeca-hidratado (12.2.2). Rolhar o *erlenmeyer*.

Agitar o *erlenmeyer* durante, pelo menos, 30 minutos. Pode ser utilizado um agitador mecânico, mas não uma barra de agitação magnética revestida a teflon, que absorveria parte do analito. Os sais adicionados não se dissolverão completamente.

Colocar o *erlenmeyer* tapado no frigorífico, a temperatura inferior a 5 °C, durante pelo menos duas horas.

Devem separar-se duas fases líquidas distintas e um resíduo sólido. A fase alcoólica deve ser límpida; caso não seja, recolocar o recipiente no frigorífico até a separação dar lugar a uma fase límpida.

Quando a fase alcoólica se apresentar límpida, tomar cuidadosamente uma alíquota (por exemplo, 10 ml), sem perturbar a fase aquosa, colocá-la num frasco de vidro ambarizado e fechar bem este último.

12.4.3. Preparação da amostra extraída a analisar

Deixar o extracto (12.4.2) em repouso até atingir a temperatura ambiente.

Pipetar 2 ml da fase alcoólica da amostra extraída à temperatura ambiente para um balão volumétrico de 20 ml, completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

12.5. Determinação

Proceder como indicado em 8.5.

12.6. Cálculo dos resultados

Os resultados são calculados pela seguinte fórmula:

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

Em que:

m_{pi} é a massa (em miligramas) de padrão interno (4.3) tomada (12.4.2)

V é o volume da amostra de teor desconhecido (50 ml)

RF_i é o factor de resposta (9.1)

área_i é a área do pico do trans-anetole

área_{pi} é a área do pico do padrão interno

Os resultados são expressos em grama por litro, com uma casa decimal.

12.7. Garantia de qualidade e controlo de qualidade

Proceder como indicado em 11.

13. Características operacionais do método (precisão)

Resultados estatísticos do teste interlaboratorial:

Os quadros seguintes reúnem os valores referentes ao anetole.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método, efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial	1998
Número de laboratórios	16
Número de amostras	10
Analito	anetole

Pastis:

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	15	15	15	13	16	16
Número de casos anómalos (laboratórios)	1	1	1	3	—	—
Número de resultados aceite	30	30	30	26	16	16
Valor médio g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Desvio-padrão relativo da repetibilidade RSD_r (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Limite de repetibilidade (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limite de reprodutibilidade (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Tipos de amostra:

A Pastis, duplicados cegos

B Pastis, duplicados cegos

C Pastis, duplicados cegos

D *Pastis*, duplicados cegos

E *Pastis*, amostra singela

F *Pastis*, amostra singela

Outras bebidas espirituosas anisadas:

Amostras	G	H	I	J
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	16	14	14	14
Número de casos anómalos (laboratórios)	—	2	1	1
Número de resultados aceite	32	28	28	28
Valor médio g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD _r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Limite de repetibilidade (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD _R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limite de reprodutibilidade (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Tipos de amostra:

G Ouzo, duplicados com teores diferentes (*)

H Anis, duplicados cegos

I Licor anisado, duplicados

J Licor anisado, duplicados

VI. ÁCIDO GLICIRRÍZICO. DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO GLICIRRÍZICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

1. Âmbito

Este método é adequado para a determinação do ácido glicirrízico em bebidas espirituosas anisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O Regulamento (CEE) n.º 1576/89 especifica que a bebida espirituosa anisada denominada «*pastis*» deve conter entre 0,05 g e 0,5 g de ácido glicirrízico por litro.

2. Referências normativas

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

3. Princípio

Determinação da concentração de ácido glicirrízico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção no ultravioleta. Filtração de uma solução-padrão e da toma para análise e injeção directa de ambas, separadamente, no sistema cromatográfico de HPLC.

4. Material e reagentes

Utilizar nas análises apenas reagentes para HPLC, etanol absoluto e água de grau 3 (escala da norma ISO 3696).

- 4.1. Etanol a 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Glicirrinato de amónio, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (sal de amónio do ácido glicirrízico)
Massa molecular: 839,98; CAS 53956-04-0; grau de pureza mínimo: 90 %.
Massa molecular do ácido glicirrízico: 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 a 50 % vol.
Para preparar 1 000 ml, a 20 °C:
— 521 ml de etanol a 96 % vol. (4.1),
— 511 ml de água (2.0).
- 4.6. Preparação das soluções de eluição para a HPLC
 - 4.6.1. Solvente de eluição A (exemplo)
80 partes (por volume) de água (2.0)
20 partes (por volume) de ácido acético (4.3)
Desgasificar o solvente de eluição durante cinco minutos.
Nota: Se a água utilizada não tiver sido microfiltrada, é conveniente filtrar o solvente de eluição preparado com um filtro para solventes orgânicos, de porosidade igual ou inferior a 0,45 µm.
 - 4.6.2. Solvente de eluição B
Metanol (4.4).
- 4.7. Preparação das soluções-padrão
Todas as soluções-padrão devem ser preparadas de fresco após dois meses.
 - 4.7.1. Solução de referência C
Pesar, com a aproximação de 0,1 mg, 25 mg de glicirrinato de amónio (4.2) num balão volumétrico de 100 ml. Adicionar um pouco de etanol a 50 % vol (4.5) e dissolver o glicirrinato de amónio. Uma vez dissolvido, completar o volume até ao traço de aferição com etanol a 50 % vol (4.5).
Filtrar com um filtro para solventes orgânicos.
 - 4.7.2. Soluções-padrão (utilizadas para verificar a linearidade de resposta dos aparelhos)
Preparar uma solução de reserva de 1,0 g/l, pesando, com a aproximação de 0,1 mg, 100 mg de glicirrinato de amónio num balão volumétrico de 100 ml. Adicionar um pouco de etanol a 50 % vol (4.5) e dissolver o glicirrinato de amónio. Uma vez dissolvido, completar o volume até ao traço de aferição com etanol a 50 % vol. (4.5).

Preparar, pelo menos, quatro outras soluções de 0,05 g/l, 0,1 g/l, 0,25 g/l e 0,5 g/l de glicirrinato de amónio, pipetando, respectivamente, 5 ml, 10 ml, 25 ml e 50 ml da solução de reserva de 1,0 g/l para uma série de balões volumétricos de 100 ml. Completar o volume até ao traço de aferição com etanol a 50 % vol. (4.5) e homogeneizar bem.

Filtrar todas as soluções com um filtro para solventes orgânicos.
5. **Aparelhagem e equipamento**
 - 5.1. Sistema de separação
 - 5.1.1. Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência
 - 5.1.2. Sistema de bombagem que permita obter e manter um caudal constante ou programado com grande precisão
 - 5.1.3. Sistema espectrofotométrico de detecção no ultravioleta, regulado para 254 nm
 - 5.1.4. Sistema de desgasificação do solvente
 - 5.2. Integrador ou registador informatizado, de características compatíveis com o resto do sistema

- 5.3. Coluna (exemplo):
Material: aço inoxidável ou vidro
Diâmetro interno: 4 mm a 5 mm
Comprimento: 100 mm a 250 mm
Fase estacionária: sílica reticulada com um grupo funcional octadecílico (C18, de preferência esférico) e granulometria máxima de 5 µm.
- 5.4. Equipamento de laboratório
- 5.4.1. Balança analítica com a precisão de 0,1 mg
- 5.4.2. Material de vidro volumétrico da classe A
- 5.4.3. Dispositivo de membranas microfiltrantes para volumes pequenos

6. Condições cromatográficas

- 6.1. Eluição (exemplo):
— Caudal: 1 ml/minuto,
— solvente A = 30 %,
— solvente B = 70 %.
- 6.2. Detecção:
— UV = 254 nm

7. Técnica

- 7.1. Preparação da amostra de bebida espirituosa
Se necessário, filtrar com um filtro para solventes orgânicos (porosidade de 0,45 µm).
- 7.2. Determinação
Depois de estabilizadas as condições cromatográficas:
— injectar 20 µl da solução de referência C (4.7.1),
— injectar 20 µl da solução da amostra,
— comparar os dois cromatogramas. Identificar os picos do ácido glicirrízico a partir dos tempos de retenção respectivos. Medir as áreas (ou alturas) desses picos e calcular a concentração em g/l, com duas casas decimais, utilizando a seguinte equação:

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

Em que:

- c é a concentração, em grama por litro, de ácido glicirrízico na bebida espirituosa analisada;
C é a concentração, em grama por litro, de glicirrizinato de amónio na solução de referência,
h é a área (ou altura) do pico do ácido glicirrízico da bebida espirituosa analisada,
H é a área (ou altura) do pico do ácido glicirrízico da solução de referência
P é o grau de pureza, em percentagem, do glicirrizinato de amónio de referência
823 é a massa de uma mole de ácido glicirrízico
840 é a massa de uma mole de glicirrizinato de amónio

8. Características operacionais do método (precisão)

Resultados estatísticos do teste interlaboratorial:
O quadro seguinte reúne os valores referentes ao ácido glicirrízico.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método, efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial 1998
 Número de laboratórios 16
 Número de amostras 5
 Analito ácido glicirrízico

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	13	14	15	16	16
Número de casos anómalos (laboratórios)	3	2	1	—	—
Número de resultados aceite	26	28	30	32	32
Valor médio g/l	0,046	0,092 (* 0,099)	0,089	0,249	0,493
Desvia-padrão da repetibilidade (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Desvio-padrão da repetibilidade (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Limite de repetibilidade (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Limite de reprodutibilidade (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Tipos de amostra:

- A *Pastis*, duplicados cegos
- B *Pastis*, duplicados com teores diferentes (*)
- C *Pastis*, duplicados cegos
- D *Pastis*, duplicados cegos
- E *Pastis*, duplicados cegos

VII. CALCONAS. MÉTODO DE VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CALCONAS EM PASTIS POR CROMATO- GRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

1. Âmbito

Este método é adequado para a pesquisa de calconas em bebidas espirituosas anisadas. As calconas são corantes da família dos flavonóides naturalmente presentes na raiz do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*).

Uma bebida espirituosa só poderá ser designada por «*pastis*» se contiver calconas [Regulamento (CEE) n.º 1576/89].

2. Referências normativas

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

3. Princípio

Preparação de uma solução de referência de extracto de alcaçuz. Determinação da presença ou ausência de calconas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção no ultravioleta.

4. Material e reagentes

Utilizar nas análises apenas reagentes para HPLC. Utilizar etanol a 96 % vol. Utilizar exclusivamente água de grau 3 (escala da norma ISO 3696).

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

- 4.3. Substância de referência: *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz)
Raízes de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) trituradas. Dimensões médias dos fragmentos: 10-15 mm de comprimento; 1-3 mm de espessura.
- 4.4. Acetato de sódio, CH₃COONa (CAS 127-09-3)
- 4.5. Ácido acético glacial, CH₃COOH (CAS 64-19-7)
- 4.6. Preparação das soluções
 - 4.6.1. Etanol a 50 % vol
Para preparar 1 000 ml, a 20 °C:
— etanol a 96 % vol. (4.1): 521 ml,
— água (2.0): 511 ml.
 - 4.6.2. Solvente A: acetonitrilo
Acetonitrilo (4.2) para HPLC.
Desgasificar.
 - 4.6.3. Solvente B: solução tampão 0,1 M de acetato de sódio, pH 4,66
Pesar 8,203 g de acetato de sódio (4.4), juntar 6,005 g de ácido acético glacial (4.5) e completar o volume até 1 000 ml com água (2) num balão volumétrico.
5. **Preparação do extracto de referência de *glycyrrhiza glabra* (4.3)**
 - 5.1. Pesar 10 g de raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) triturada para um balão de destilação de fundo plano.
— Adicionar 100 ml de etanol a 50 % vol. (4.6.1).
— Manter em ebulição sob refluxo durante uma hora.
— Filtrar.
— Guardar o filtrado para mais tarde.
 - 5.2. Recuperação do extracto de alcaçuz do filtro
— Colocar o filtro num balão de destilação de fundo plano.
— Adicionar 100 ml de etanol a 50 % vol. (4.6.1).
— Manter em ebulição sob refluxo durante uma hora.
— Filtrar. Guardar o filtrado para mais tarde.
 - 5.3. Efectuar a extracção da raiz de alcaçuz por três vezes, sucessivamente
 - 5.4. Juntar os três filtrados
 - 5.5. Evaporar o solvente (de 5.4) num evaporador rotativo
 - 5.6. Adicionar 100 ml de etanol a 50 % vol. (4.6.1) ao resíduo do extracto (de 5.5)
6. **Aparelhagem e equipamento**
 - 6.1. Sistema de separação
 - 6.1.1. Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência
 - 6.1.2. Sistema de bombagem que permita obter e manter um caudal constante ou programado a alta pressão.
 - 6.1.3. Sistema espectrofotométrico de detecção no ultravioleta/visível, regulável para 254 nm e 370 nm.
 - 6.1.4. Sistema de desgasificação do solvente.
 - 6.1.5. Fornalha da coluna, regulável a 40 °C ± 0,1 °C.
 - 6.2. Integrador ou registador informatizado, de características compatíveis com o resto do sistema de separação.

- 6.3. Coluna
- Material: aço inoxidável ou vidro
- Diâmetro interno: 4 mm a 5 mm
- Fase estacionária: sílica reticulada com um grupo funcional octadecílico (C18) e granulometria máxima de 5 µm (fase reticulada).
- 6.4. Equipamento corrente de laboratório, nomeadamente:
- 6.4.1. Balança analítica (precisão ± 0,1 mg).
- 6.4.2. Dispositivo de destilação com condensador de refluxo, incluindo, por exemplo:
- um balão de fundo plano de 250 ml com junta de vidro esmerilado normalizada,
 - um condensador de refluxo de 30 cm, e
 - uma fonte de calor (tomar as providências necessárias para evitar qualquer reacção pirogénica das matérias em extracção).
- 6.4.3. Evaporador rotativo
- 6.4.4. Dispositivo de filtração (funil de Büchner)
- 6.5. Condições cromatográficas (exemplo)
- 6.5.1. Condições de eluição dos solventes A (4.6.2) e B (4.6.3):
- gradiente de variação de 20/80 (v/v) para 50/50 (v/v) em 15 minutos,
 - gradiente de variação de 50/50 (v/v) para 75/25 (v/v) em cinco minutos,
 - manutenção a 75/25 (v/v) durante cinco minutos,
 - estabilização da coluna entre as injeções,
 - manutenção a 20/80 (v/v) durante cinco minutos.
- 6.5.2. Caudal: 1 ml/minuto
- 6.5.3. Regulação do detector de UV:
- Regular o detector para 370 nm para a detecção da presença de calconas e, em seguida, para 254 nm, para a detecção do ácido glicirrízico.
- Nota:* A mudança de comprimento de onda (de 370 nm para 254 nm) deve ser efectuada 30 segundos antes do início do pico de eluição do ácido glicirrízico.

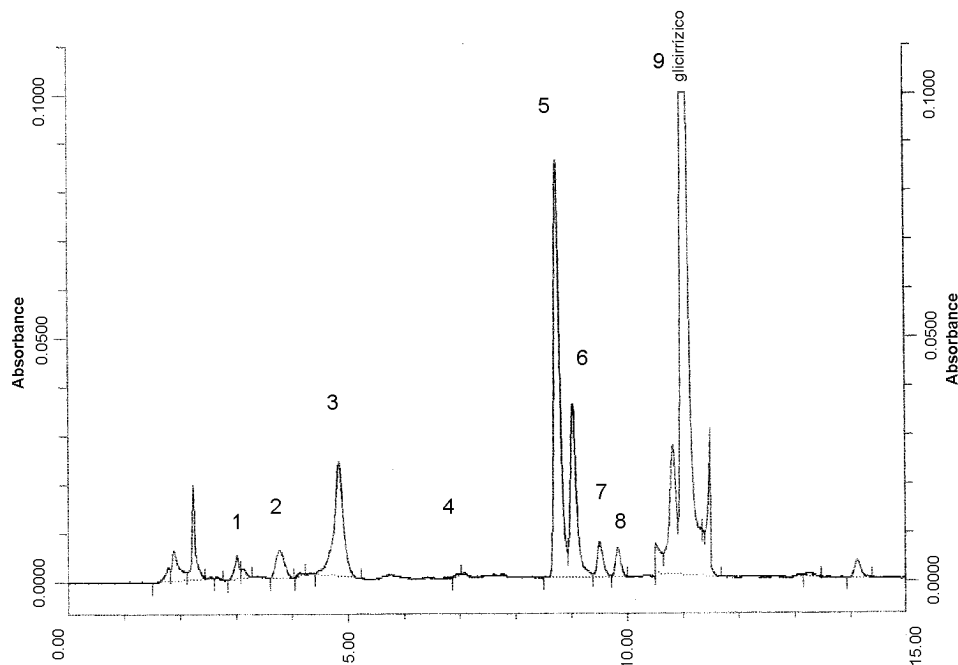
7. Técnica

- 7.1. Preparação da amostra de bebida espirituosa
- Filtrar com um filtro para solventes orgânicos (porosidade de 0,45 µm).
- 7.2. Preparação do extracto residual de alcaçuz (5.6)
- Preparar uma diluição 1:10 com etanol a 50 % vol. (4.6.1) antes da análise.
- 7.3. Determinação.
- 7.3.1. Injectar 20 µl do extracto de alcaçuz preparado (7.2). Efectuar a análise nas condições cromatográficas acima descritas (6.5).
- 7.3.2. Injectar 20 µl da amostra (7.1) da bebida espirituosa anisada. Efectuar a análise nas condições cromatográficas acima descritas (6.5).
- 7.3.3. Comparar os dois cromatogramas. Devem ser muito semelhantes na zona de saída das calconas, durante a detecção a 370 nm nas condições cromatográficas acima descritas (ver a figura 1).

8. Cromatograma característico de um *pastis*

Figura 1:

Cromatograma obtido pelo método acima descrito, revelador da presença de calconas num «*pastis*». Os picos 1 a 8 correspondem às calconas; o pico 9 ao ácido glicirrízico.



9. Características operacionais do método (precisão)

Resultados do teste interlaboratorial:

O quadro seguinte apresenta as características operacionais do método de reconhecimento da presença ou ausência de calconas em «*pastis*» e bebidas espirituosas anisadas.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método, efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial	1998
Número de laboratórios	14
Número de amostras	11
Analitos	calconas

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	14	14	14	14	14	13
Número de casos anómalos (laboratórios)	—	—	—	—	—	1 (*)
Número de resultados aceite	28	14	14	28	28	26
Número de confirmações da presença de calconas	28	14	14	0	28	0
Número de confirmações da ausência de calconas	0	0	0	28	0	26
Percentagem de resultados correctos (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Incoerência dos resultados de dois duplicados, atribuída a um erro de constituição da amostra.

Amostras	G	H	I	J	K
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	14	14	14	14	14
Número de casos anómalos (laboratórios)	—	—	—	—	—
Número de resultados aceite	28	14	14	28	28
Número de confirmações da presença de calconas	0	0	0	0	0
Número de confirmações da ausência de calconas	28	14	14	28	28
Percentagem de resultados correctos (%)	100	100	100	100	100

Tipos de amostra:

- A *Pastís*, duplicados cegos
- B *Pastís*, amostra singela
- C *Pastís*, amostra singela
- D «*Pastís*» (sem calconas), duplicados cegos
- E «*Pastís*» (sem calconas), duplicados cegos
- F Licor anisado (sem calconas), duplicados cegos
- G Licor anisado (sem calconas), duplicados cegos
- H Ouzo (sem calconas), amostra singela
- I Ouzo (sem calconas), amostra singela
- J Anis (sem calconas), duplicados cegos
- K «*Pastís*» (sem calconas), duplicados cegos

IX. GEMA DE OVO. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GEMA DE OVO EM BEBIDAS ESPIRITUOSAS — MÉTODO FOTOMÉTRICO

1. Âmbito

Este método é adequado para a determinação de concentrações de gema de ovo entre 40 g/l e 250 g/l em licores de ovos e licores à base de ovos.

2. Referências normativas

ISO 3696:1897 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

3. Princípio

Extracção dos compostos de fósforo solúveis em etanol existentes na gema de ovo e determinação fotométrica dos mesmos na forma de um complexo de fosfomolibdato.

4. Material e reagentes

- 4.1. Água bidestilada.
- 4.2. Terra de diatomáceas.
- 4.3. Etanol a 96 % vol (CAS 64-17-5).
- 4.4. Solução a 15 % de acetato de magnésio (CAS 16674-78-5).
- 4.5. Ácido sulfúrico a 10 % (CAS 7664-93-9).

- 4.6. Ácido sulfúrico 1 N.
- 4.7. Solução 0,16 g/l de di-hidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4 (CAS 778-77-0).
- 4.8. Reagente para a determinação dos fosfatos:
Dissolver 20 g de molibdato de amónio, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (CAS 12054-85-2), em 400 ml de água a 50 °C.
Dissolver, noutra recipiente, 1 g de vanadato de amónio, NH_4VO_3 (CAS 7803-55-6), em 300 ml de água quente; deixar arrefecer e adicionar 140 ml de ácido nítrico concentrado (CAS 7697-37-2). Juntar as soluções arrefecidas num balão volumétrico de 1 000 ml e completar o volume até ao traço de aferição.

5. Aparelhagem e equipamento

- 5.1. *Erlenmeyer* de 100 ml.
- 5.2. Banho de ultra-sons (ou agitador magnético).
- 5.3. Balão volumétrico de 100 ml.
- 5.4. Banho de água a 20 °C.
- 5.5. Filtro (Whatman n.º 4 ou equivalente).
- 5.6. Cadinho de porcelana (ou de platina).
- 5.7. Banho de água fervente.
- 5.8. Placa de aquecimento.
- 5.9. Mufla.
- 5.10. Balão volumétrico de 50 ml.
- 5.11. Balão volumétrico de 20 ml.
- 5.12. Espectrofotómetro regulado para 420 nm.
- 5.13. Célula de 1 cm.

6. Amostras

As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente até às análises.

7. Técnica

- 7.1. Preparação da amostra
 - 7.1.1. Pesar 10 g da amostra num *erlenmeyer* de 100 ml (5.1).
 - 7.1.2. Adicionar gradualmente, em pequenas quantidades, 70 ml de etanol (4.3), agitando após cada adição; colocar o recipiente num banho de ultra-sons (5.2) durante 15 minutos (ou agitar a mistura com um agitador magnético (5.2), durante 10 minutos, à temperatura ambiente).
 - 7.1.3. Transferir o conteúdo do *erlenmeyer* para um balão volumétrico de 100 ml (5.3), lavando com etanol (4.3). Completar o volume com etanol (4.3) até ao traço de aferição e colocar o balão num banho de água a 20 °C (5.4). Completar o volume até ao traço de aferição, a 20 °C.
 - 7.1.4. Adicionar uma pequena quantidade de terra de diatomáceas (4.2) e filtrar (5.5), rejeitando os primeiros 20 ml.
 - 7.1.5. Transferir 25 ml do filtrado para um cadinho de porcelana (ou de platina) (5.6). Concentrar, em seguida, o filtrado por evaporação suave num banho de água fervente (5.7), adicionando 5 ml da solução a 15 % de acetato de magnésio (4.4).
 - 7.1.6. Colocar o cadinho numa placa de aquecimento (5.8) e aquecer até à secura.
 - 7.1.7. Incinerar o resíduo, por aquecimento até à incandescência, a 600 °C, numa mufla (5.9), até as cinzas ficarem brancas, no mínimo durante 1,5 horas (mas podendo ser deixado de um dia para o outro).
 - 7.1.8. Juntar 10 ml de ácido sulfúrico a 10 % (4.5) às cinzas e transferir a solução resultante, com lavagens sucessivas de água destilada (4.1), para um balão volumétrico de 50 ml (5.10); completar o volume até ao traço de aferição, à temperatura ambiente, com água destilada (4.1). Utilizar uma alíquota de 5 ml desta solução de cinzas na preparação da solução-amostra para a determinação fotométrica dos fosfatos.
- 7.2. Determinação fotométrica dos fosfatos.
 - 7.2.1. Solução de comparação.
 - 7.2.1.1. Deitar 10 ml de ácido sulfúrico a 10 % (4.5) num balão volumétrico de 50 ml (5.10) e completar o volume com água destilada até ao traço de aferição (4.1).

- 7.2.1.2. Num balão volumétrico de 20 ml (5.11), juntar a uma alíquota de 5 ml desta solução (7.2.1.1) 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) e 2 ml do reagente para a determinação dos fosfatos (4.8); completar o volume até 20 ml com água destilada (4.1).
- 7.2.1.3. Tapar, mantendo a tampa solta, agitar e aquecer o balão num banho de água fervente (5.7), durante 10 minutos, arrefecendo depois num banho de água a 20 °C (5.4), durante 20 minutos.
- 7.2.1.4. Encher uma célula de 1 cm (5.13) com esta solução de comparação.
- 7.2.2. Solução-amostra.
- 7.2.2.1. Num balão volumétrico de 20 ml (5.11), juntar a uma alíquota de 5 ml da solução de cinzas (7.1.8) 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) e 2 ml do reagente para a determinação dos fosfatos (4.8); completar o volume até 20 ml com água destilada (4.1).
- 7.2.2.2. Tapar, mantendo a tampa solta, agitar e aquecer o balão num banho de água fervente (5.7), durante 10 minutos, arrefecendo depois num banho de água a 20 °C (5.4), durante 20 minutos.
- 7.2.2.3. Analisar de imediato, por espectrofotometria (5.12), a solução amarela formada, numa célula de 1 cm (5.13), a 420 nm, em relação à solução de comparação (7.2.1.4).
- 7.2.3. Curva de calibração.
- 7.2.3.1. Para traçar a curva de calibração, juntar alíquotas de 2 ml do reagente para a determinação dos fosfatos (4.8) a uma série de balões volumétricos de 20 ml (5.11) que já contenham 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) e, respectivamente, 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ml da solução de di-hidrogenofosfato de potássio (4.7); completar os volumes até ao traço de aferição de 20 ml com água destilada (4.1).
- 7.2.3.2. Tapar, mantendo a tampa solta, agitar e aquecer os balões num banho de água fervente (5.7), durante 10 minutos, arrefecendo depois num banho de água a 20 °C (5.4), durante 20 minutos; efectuar a análise espectrofotométrica (5.12), numa célula de 1 cm (5.13), a 420 nm, em relação à solução de comparação (7.2.1.4).

- 7.2.3.3. Traçado da curva de calibração:

Solução de di-hidrogenofosfato (ml)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. Expressão dos resultados

O teor de gema de ovo, em g/l, é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{gema de ovo (g/L)} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{densidade}}{E/40}$$

Em que:

110	factor de conversão em P ₂ O ₅ total, em g por 100 g de gema de ovo,
mg de P ₂ O ₅	valor determinado pela curva de calibração,
densidade	massa por unidade de volume (g/ml) do licor à base de gema de ovo, a 20 °C,
E	massa, em g, do licor à base de gema de ovo,
40	factor de diluição da alíquota de 5 ml da solução de cinzas.

9. Características operacionais do método (precisão)

Resultados estatísticos do teste interlaboratorial:

O quadro seguinte reúne os valores referentes à gema de ovo.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método, efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial:	1998
Número de laboratórios:	24
Número de amostras:	5
Analito:	Gema de ovo

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	19	20	22	20	22
Número de casos anómalos (laboratórios)	3	4	2	4	2
Número de resultados aceite	38	40	44	40	44
Valor médio	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Límite de repetibilidade (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Límite de reprodutibilidade (R) g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Tipos de amostra:

- A Advocaat, Duplicados cegos
- B Advocaat, Duplicados cegos
- C Advocaat, Duplicados cegos
- D Advocaat (diluído), Duplicados com teores diferentes (*)
- E Advocaat, Duplicados cegos