

TEBLİĞ

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığından:

**TÜRK GIDA KODEKSİ DİSTİLE ALKOLLÜ İÇKİLER
ANALİZ METOTLARI TEBLİĞİ
(TEBLİĞ NO: 2013/11)**

Amaç ve kapsam

MADDE 1 – (1) Bu Tebliğın amacı, distile alkollü içkilerin resmi kontrolleri için uygulanacak analiz metotlarını düzenlemektir.

Dayanak

MADDE 2 – (1) Bu Tebliğ;

a) 29/12/2011 tarihli ve 28157 üçüncü mükerrer sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine dayanılarak,

b) Avrupa Birliğinin 19/12/2000 tarihli ve 2870/2000/EC sayılı Distile Alkollü İçkilerin Analizi ile İlgili Topluluk Referans Metotları Komisyon Tüzüğüne paralel olarak, hazırlanmıştır.

Tanımlar

MADDE 3 – (1) Bu Tebliğ’de geçen;

a) CAS: Bilimsel literatürde tanımlanmış her bir kimyasal bileşik için verilen, Amerikan Kimya Derneği’nin kayıt numaralarını,

b) Distile Alkollü İçkiler Tebliği: 16/3/2005 tarihli ve 25757 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Distile Alkollü İçkiler Tebliği (Tebliğ No: 2005/11)’ni,

c) EİPT: Uluslararası Pratik Sıcaklık Ölçeğini,

ç) FID: Alev iyonlaşma dedektörünü,

d) GC: Gaz kromatografisini,

e) HMCE: İngiliz Gümrük ve Vergi Kurumunu,

f) HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisini,

g) ISO: Uluslararası Standardizasyon Teşkilatını,

ğ) IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliğini,

h) Kesinlik: Analiz sonucu ve kabul edilen referans değer arasındaki yakınlığı,

ı) OİML: Uluslararası Yasal Metroloji Organizasyonunu,

i) OİV: Uluslararası Bağcılık ve Şarapçılık Örgütünü,

j) Splitli enjeksiyon: Girişte bölünmeli enjeksiyon sistemini,

k) Splitless enjeksiyon: Bölünmesiz enjeksiyon sistemini,

l) Split/Splitless enjektör: Bölünmeli/Bölünmesiz enjektörü,

m) Tekrar edilebilirlik sınırı: Aynı numune, aynı uygulayıcı, aynı cihaz, aynı laboratuvar gibi tekrar edilebilirlik koşulları altında kısa zaman aralıklarıyla yapılan iki analiz sonucu arasındaki (genellikle % 95 olan belirli bir güven aralığında) mutlak farka eşit veya mutlak farkın altındaki bir değer,

n) TS: Türk standartlarını,

o) Yeniden üretilebilirlik sınırı: Aynı numunede, aynı metot kullanılarak, farklı uygulayıcı, farklı cihaz, farklı laboratuvar gibi yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen iki analiz sonucu arasındaki (genellikle % 95 olan belirli bir güven aralığında) mutlak farka eşit veya mutlak farkın altındaki bir değer,

ö) UV: Ultraviyoleyi

ifade eder.

Analiz metodu

MADDE 4 – (1) Distile Alkollü İçkiler Tebliğine uygunluğunun resmi kontrollerinde uygulanacak referans analiz metotları eklerde yer almaktadır.

a) Eklerde yer alan referans metotların haricindeki diğer analitik metotlar; bir laboratuvar yöneticisinin sorumluluğu altında, sonuçların doğruluğu ve kesinliği (tekrar edilebilirliği ve yeniden üretilebilirliği) eklerde verilen ilgili referans metotlardan elde edilen sonuçlara eşdeğer olması şartıyla kabul edilir. Şahit analizlerde, bu metotlar eklerde verilen referans analitik metotların yerini alamazlar.

b) Özel bir distile alkollü içkinin içerdii maddelerin saptanması ve miktarının belirlenmesi için eklerde analitik referans metotlar düzenlenmemişse aşağıdaki metotlar kullanılır:

1) Uluslararası kabul edilen prosedürler düzeyinde geçerli kılınmış ve özellikle 29/12/2011 tarihli ve 28157 üçüncü mükerrer sayılı Resmî Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren Gıda Kontrol Laboratuvarlarının Kuruluş, Görev, Yetki ve Sorumlulukları ile Çalışma Usul ve Esaslarının Belirlenmesine Dair Yönetmeliğin 21 inci maddesinin

ikinci fıkrasındaki kriterleri karşılayan analitik metotlar,

2) ISO'nun öngördüğü standartlara uygun metotlar,

3) OIV'nin tanıdığı ve bu Örgüt tarafından yayımlanan analitik metotlar,

4) (1), (2) ve (3) numaralı alt bentlerde sözü edilen metotların olmadığı durumda; kesinlik, tekrar edilebilirlik ve yeniden üretilebilirlik koşullarını sağlaması şartıyla, uygun başka bir analitik metot.

Uyum zorunluluğu

GEÇİCİ MADDE 1 – (1) Halen faaliyet gösteren ve bu Tebliğ kapsamında yer alan ürünlerde resmi kontroller için analiz yapan kurum ve kuruluşlar, bir yıl içerisinde bu Tebliğ hükümlerine uymak zorundadırlar.

Yürürlük

MADDE 5 – (1) Bu Tebliğ yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

Yürütme

MADDE 6 – (1) Bu Tebliğ hükümlerini Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı yürütür.

Ek-1

HACMEN ALKOL MİKTARININ BELİRLENMESİ

Bu referans metot iki bölümden oluşur.

Bölüm 1: Distilatın hazırlanması

Bölüm 2: Distilatın Yoğunluğunun Ölçülmesi

1. Kapsam

Bu metot, distile alkollü içkilerin hacmen gerçek alkol miktarının belirlenmesi için kullanılır.

2. Tanımlar

Analizlerde kullanılacak su, TS EN ISO 3696 (Su - Analitik Laboratuvarında Kullanılan - Özellikler ve Deney Metotları)'da tanımlanmıştır.

Bu metot içerisindeki “alkol”, “etil alkol” ü ifade eder.

2.1. Referans Sıcaklık:

Distile alkollü içkilerde özgül ağırlık, yoğunluk ve hacmen alkol miktarının belirlenmesi için referans sıcaklık 20 °C'dir. Referans sıcaklıktan farklı sıcaklıklarda yapılan tüm ölçümler (hacmen alkol miktarı veya yoğunluk ölçümleri) için “t °C” ifadesi kullanılır.

2.2. Yoğunluk:

Yoğunluk, 20 °C'de bir metreküp distile alkollü içkinin kilogram cinsinden (kg/m³) kütlesi olarak ifade edilir ve ρ_{20} veya $\rho_{20\text{ }^{\circ}\text{C}}$ olarak gösterilir.

2.3. Özgül ağırlık:

Özgül ağırlık, bir ondalık sayı ile ifade edilen, 20 °C'de distile alkollü içkinin yoğunluğunun aynı sıcaklıktaki suyun yoğunluğuna oranıdır. Sonuç, $d_{20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}}$ veya $d_{20/20}$ veya karışma olasılığı yok ise d şeklinde gösterilir. Ölçülen karakteristik özellik, sadece tanımlanan bu simgeler kullanılarak analiz sertifikasında belirtilir.

Not: Özgül ağırlığın, 20 °C'deki yoğunluktan ρ_{20} 'den elde edilmesi mümkündür:

$$\rho_{20\text{ }^{\circ}\text{C}} = 998,203 \times d_{20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}} \text{ veya } d_{20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}} = \rho_{20\text{ }^{\circ}\text{C}} / 998,203$$

Formülde 998,203 değeri, suyun 20 °C'deki yoğunluğudur.

2.4. Hacmen gerçek alkol miktarı:

Distile alkollü içkilerin hacmen gerçek alkol miktarı, distilat ya da alkol ile aynı yoğunluğa sahip 100 litre alkol-su karışımı içindeki etil alkolün litre olarak miktarıdır.

Kullanılacak farklı alkol-su karışımlarının 20 °C'de yoğunluğunun fonksiyonu olarak 20 °C'de hacmen (%hacmen) alkol miktarının değerini veren “Alkol Tabloları”, OIML tarafından kabul edilmiş olan uluslararası tablolarıdır (OIML 22 no'lu Tavsiye Kararı, 1975).

Belirli bir sıcaklıkta hacmen alkol miktarı ile bir alkol-su karışımının yoğunluğu arasındaki ilişkiyi gösteren genel formül aşağıda verildiği gibidir.

Alkol-su karışımlarının alkol miktarı tablolarının hesaplanmasında kullanılan formül:

$t^{\circ}\text{C}$ sıcaklığındaki bir alkol-su karışımının m^3 başına kilogram olarak (kg/m^3) yoğunluğu aşağıdaki formülle şu bilgiler ışığında hesaplanır:

- Ondalık olarak ifade edilen kütlece alkol miktarı, p (örneğin, kütlece %12 alkol miktarı için $p = 0,12$)
- $^{\circ}\text{C}$ olarak ifade edilen sıcaklık, t (EİPT 68)
- Formüldeki Sayısal Katsayılar Tablosu'nda (Tablo-1) verilen sayısal katsayılar

Formül (-20) ile $+40^{\circ}\text{C}$ arasındaki sıcaklıklar için geçerlidir.

$$\rho = A_1 + \sum_{k=2}^{12} A_k p^{k-1} + \sum_{k=1}^6 B_k (t-20^{\circ}\text{C})^k + \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m C_{i,k} p^{k(t-20^{\circ}\text{C})^i}$$

$$n = 5, m_1 = 11, m_2 = 10, m_3 = 9, m_4 = 4, m_5 = 2$$

Tablo-1

Formüldeki Sayısal Katsayılar Tablosu

k	A_k kg/m ³	B_k
1	9,982 012 300 . 10 ²	- 2,061 851 3 . 10 ⁻¹ kg/(m ³ . °C)
2	- 1,929 769 495 . 10 ²	- 5,268 254 2 . 10 ⁻³ kg/(m ³ . °C ²)
3	3,891 238 958 . 10 ²	3,613 001 3 . 10 ⁻⁵ kg/(m ³ . °C ³)
4	- 1,668 103 923 . 10 ³	- 3,895 770 2 . 10 ⁻⁷ kg/(m ³ . °C ⁴)
5	1,352 215 441 . 10 ⁴	7,169 354 0 . 10 ⁻⁹ kg/(m ³ . °C ⁵)
6	- 8,829 278 388 . 10 ⁴	- 9,973 923 1 . 10 ⁻¹¹ kg/(m ³ . °C ⁶)
7	3,062 874 042 . 10 ⁵	
8	- 6,138 381 234 . 10 ⁵	
9	7,470 172 998 . 10 ⁵	
10	- 5,478 461 354 . 10 ⁵	
11	2,234 460 334 . 10 ⁵	
12	- 3,903 285 426 . 10 ⁴	
k	$C_{1,k}$ kg/(m ³ . °C)	$C_{2,k}$ kg/(m ³ . °C ²)
1	1,693 443 461 530 087 . 10 ⁻¹	- 1,193 013 005 057 010 . 10 ⁻²
2	- 1,046 914 743 455 169 . 10 ¹	2,517 399 633 803 461 . 10 ⁻¹
3	7,196 353 469 546 523 . 10 ¹	- 2,170 575 700 536 993
4	- 7,047 478 054 272 792 . 10 ²	1,353 034 988 843 029 . 10 ¹
5	3,924 090 430 035 045 . 10 ³	- 5,029 988 758 547 014 . 10 ¹
6	- 1,210 164 659 068 747 . 10 ⁴	1,096 355 666 577 570 . 10 ²
7	2,248 646 550 400 788 . 10 ⁴	- 1,422 753 946 421 155 . 10 ²
8	- 2,605 562 982 188 164 . 10 ⁴	1,080 435 942 856 230 . 10 ²
9	1,852 373 922 069 467 . 10 ⁴	- 4,414 153 236 817 392 . 10 ¹
10	- 7,420 201 433 430 137 . 10 ³	7,442 971 530 188 783
11	1,285 617 841 998 974 . 10 ³	

k	$C_{3,k}$ kg/(m ³ . °C3)	$C_{4,k}$ kg/(m ³ . °C4)	$C_{5,k}$ kg/(m ³ . °C5)
1	- 6,802 995 733 503 803 . 10 ⁻⁴	4,075 376 675 622 027 . 10 ⁻⁶	2,788 074 354 782 409 . 10 ⁻⁸
2	1,876 837 790 289 664 . 10 ⁻²	- 8,763 058 573 471 110 . 10 ⁻⁶	1,345 612 883 493 354 . 10 ⁻⁸
3	- 2,002 561 813 734 156 . 10 ⁻¹	6,515 031 360 099 368 . 10 ⁻⁶	
4	1, 022 992 966 719 220	- 1,515 784 836 987 210 . 10 ⁻⁶	
5	- 2,895 696 483 903 638		
6	4,810 060 584 300 675		
7	- 4,672 147 440 794 683		
8	2,458 043 105 903 461		
9	- 5,411 227 621 436 812. 10 ⁻¹		

Not: Hacmin doğru olarak ölçülmesinin çok zor olduğu likörler ve krem likörler için, numuneler tartılmalı ve alkol miktarı ilk önce kütle üzerinden hesaplanmalıdır.

Dönüşüm formülü:

$$\text{Hacmen alkol miktarı (\%hacim)} = \frac{\text{KAM}(\%k\ddot{u}tle) \times \rho_{20}(\text{numune})}{\rho_{20}(\text{Alkol})}$$

KAM = Kütlece alkol miktarı

$$\rho_{20}(\text{alkol}) = 789,24 \text{ kg/m}^3$$

3. Prensiip

Distilasyonu takiben, distilatın hacmen alkol miktarı piknometre, elektronik dansimetre veya hidrostatik terazili dansimetre kullanılarak belirlenir.

Bölüm 1: Distilatın Hazırlanması

1. Kapsam

Bu metot, distile alkollü içkilerin hacmen gerçek alkol miktarının belirlenmesinde kullanılacak olan distilatların hazırlanması için kullanılır.

2. PrensiP

Yüksek alkollü içkiler, etil alkol ve diğer uçucu bileşenleri ekstrakte edilebilen maddelerden (distile edilmeyen maddeler) ayırmak için distile edilir.

3. Reaktifler ve materyaller

3.1. Kaynama taşı

3.2. Yoğunlaştırılmış köpük önleyici emülsiyon (krem likörler için)

4. Araç ve gereçler

Genel olarak kullanılan laboratuvar cihazları ve ayrıca aşağıdaki araç gereçler kullanılır:

4.1. 10-15 °C arasında ayarlanabilir su banyosu

20 °C'ye ($\pm 0,2$ °C) ayarlanabilir su banyosu

4.2. Sırasıyla %0,1 ve %0,15'e kadar hassasiyette, sertifikalı 100 mL ve 200 mL hacimli A sınıfı balon jöjeler

4.3. Distilasyon düzeneği

4.3.1. Genel şartlar

Distilasyon düzeneği aşağıdaki koşulları karşılamalıdır:

- Sistemden alkol kaçışını engelleyecek en az sayıda bağlantı noktası içermelidir.
- Kaynayan sıvının buharla birlikte sürüklenmesini önleyecek ve alkolce zengin buharın distilasyon oranını düzenleyecek şekilde dizayn edilmiş bir cihaz içermelidir.
- Alkol buharının hızlı ve tam yoğuşması sağlamalıdır.
- İlk distilasyon fraksiyonlarının sulu bir ortam içinde toplanmasını sağlamalıdır.

Kaynatma amacıyla kullanılan ısı kaynağı, alkollü içki içerisindeki ekstrakte edilebilen maddenin herhangi bir pirojenik reaksiyonunu önleyecek uygun bir ısı dağıtıcısına sahip olmalıdır.

4.3.2 Uygun distilasyon düzeneğinin bir örneği Şekil 1'de gösterilmiş olup aşağıdaki kısımlardan oluşmaktadır:

- 1 litrelik, standardize küresel şilifli, tabanı yuvarlak balon (distilasyon balonu)
- En az 20 cm yükseklikte bir rektifiye kolonu (örneğin bir Vigreux kolonu)
- Yaklaşık 10 cm uzunluğunda, her iki ucu küresel şilifli ve rektifiye kolonu ile geri soğutucu arasında dik dirsek bağlantısı bulunan düz çerçevevi yoğuşturucu (West yoğuşturucu)
- 40 cm uzunluğunda geri soğutucu
- Distilatı, az miktarda su içeren distilat toplama balonunun (balon jöje) dibine ileten ağzı küresel şilifli boşaltma tüpü

Not: Yukarıda tarif edilen düzenek en az 200 mL'lik bir numune için tasarlanmıştır. Ancak, daha az miktardaki numuneler (örneğin 100 mL), sürüklenmeyi önleyecek sıçratma başlığı ya da buna benzer başka bir cihaz içeren daha küçük bir distilasyon balonu kullanılarak distile edilebilir.

5. Analiz numunelerinin depolanması

Numuneler, analiz öncesi oda sıcaklığında saklanır.

6. İşlem

Ön bilgi:

Distilasyon işlemi IUPAC (1968) tarafından yayımlanan işlemle de yapılabilir.

6.1. Distilasyon düzeneğinin doğrulanması: Kullanılan düzenek en az aşağıdaki yeterlilikte olmalıdır:

%50'ye yakın bilinen bir konsantrasyondaki alkol-su karışımının 200 mL'sinin distilasyonundaki alkol kaybı hacmen %0,1'den daha fazla olmamalıdır.

6.2. Hacmen alkol miktarı %50'den düşük olan distile alkollü içkiler:

Bir balon joje içerisine 200 mL numune alınır. Numunenin sıcaklığı kaydedilir ya da standart sıcaklığa (20 °C) getirilir. Numune, distilasyon balonuna aktarılır ve balon joje üç kez her seferde yaklaşık 20 mL distile su ile çalkalanır. Her bir bölüm çalkalama suyu, distilasyon balonu içeriğine eklenir.

Not: Bu 60 mL'lik sulandırma, litre başına 250 g'dan daha az kuru madde içeren distile alkollü içkiler için yeterlidir. Aksi halde, pirolizin önlenmesi için, kuru madde konsantrasyonu 300 g/L ise çalkalama suyunun hacminin en az 70 mL; 400 g/L için, 85 mL ve 500 g/L (bazı meyve likörleri veya krem likörler) için, 100 mL olması gerekmektedir. Farklı hacimlerdeki numuneler için bu hacimler oransal olarak ayarlanır.

Birkaç adet kaynama taşı (3.1) eklenir (Krem likörler için köpük önleyici eklenir).

Distilatın içinde toplanacağı 200 mL'lik balon joje içerisine 20 mL distile su aktarılır. Balon joje daha sonra bir soğuk su banyosuna (4.1) yerleştirilmelidir (anason aromalı distile alkollü içkiler için 10-15 °C).

Sürüklenmeye ve kömürleşmeye izin vermeden distilasyon balonu arada bir çalkalanarak; distilat seviyesi, balon jogenin kalibrasyon işaretinin birkaç mL altına ulaşana kadar distile edilir. Distilatın sıcaklığı, başlangıç sıcaklığından 0,5 °C aşağı düştüğü zaman, işaretli seviyeye kadar distile su ile doldurulur ve iyice karıştırılır.

Distilat, hacmen alkol miktarının belirlenmesi (Bölüm 2) için kullanılır.

6.3. Hacmen alkol miktarı %50'nin üzerinde olan distile alkollü içkiler:

100 mL'lik bir balon joje içerisine 100 mL numune alınır. Numune, distilasyon balonuna aktarılır ve balon joje, distile su ile birkaç kez çalkalanır ve çalkalama suyu distilasyon balonu içeriğine eklenir. Balon joje içeriği yaklaşık 230 mL olacak kadar su kullanılır.

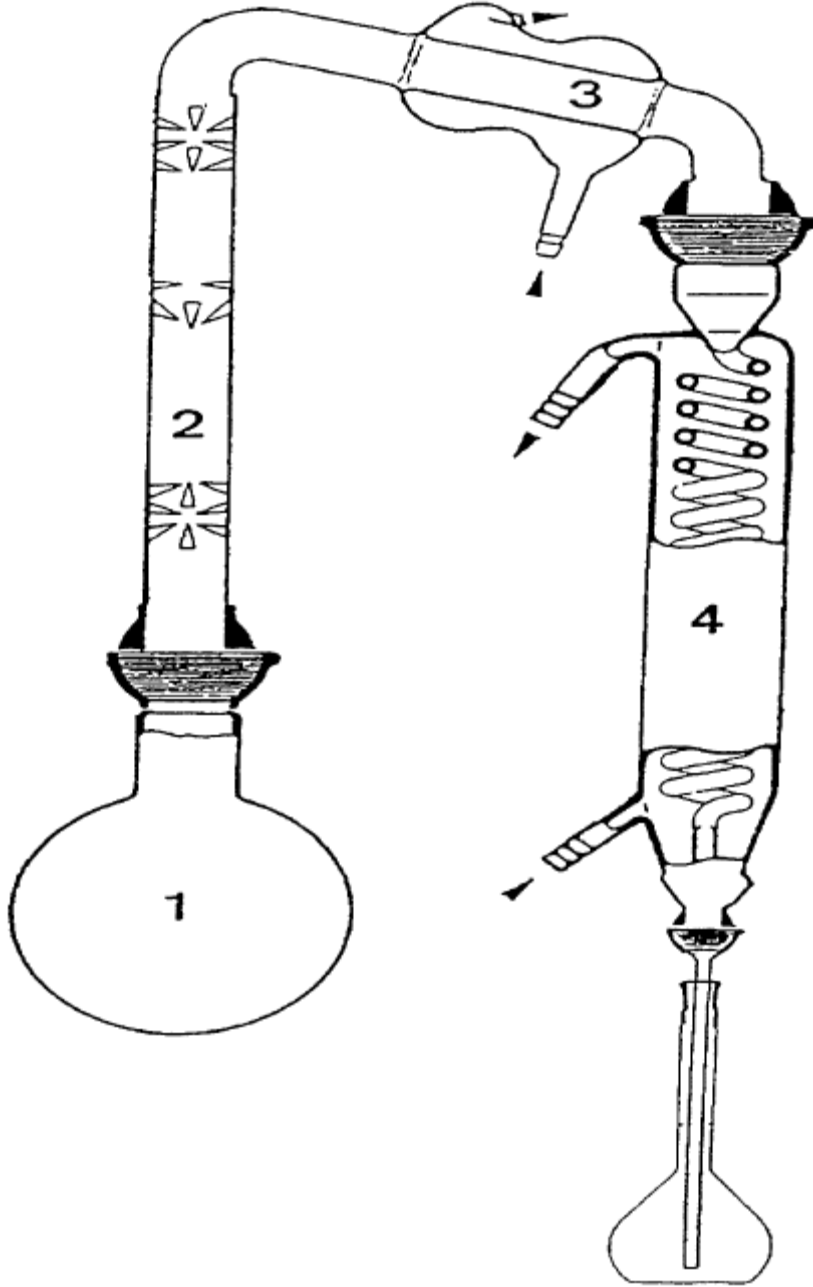
Distilatın içinde toplanacağı 200 mL'lik balon joje içerisine 20 mL distile su aktarılır. Balon joje daha sonra bir soğuk su banyosuna (4.1) yerleştirilmelidir (anason aromalı distile alkollü içkiler için 10-15 °C).

Distilasyon balonu arada bir çalkalanarak, Distilat seviyesi 200 mL'lik balon jogenin kalibrasyon işaretinin birkaç mL altına ulaşana kadar distile edilir.

Distilatın sıcaklığı, başlangıç sıcaklığından 0,5 °C aşağı düştüğü zaman, işaretli seviyeye kadar distile su ile doldurulur ve iyice karıştırılır.

Distilat, hacmen alkol miktarının belirlenmesi (Bölüm 2) için kullanılır.

Not: Distile alkollü içkinin hacmen alkol miktarı, distilatın alkol miktarının iki katıdır.



Şekil 1. Distile alkollü içkilerin hacmen gerçek alkol miktarının ölçülmesi için kullanılan distilasyon düzeneği

1. Küresel şifli, tabanı yuvarlak bir litrelik balon
2. Vigreux rektifiye kolonu, 20 cm
3. Düz çerçevesi West yoğuşturucu, 10 cm
4. Geri soğutucu, 40 cm

Bölüm 2: Distilatın Yoğunluğunun Ölçülmesi

Metot A: Distile Alkollü İçkilerin Hacmen Gerçek Alkol Miktarlarının Belirlenmesi - Piknometre İle Ölçüm

1. Prensip

Hacmen alkol miktarı, piknometre ile ölçülen distilatın yoğunluğundan elde edilir.

2. Reaktifler

Analizlerde aksi belirtilmedikçe, yalnızca analitik saflıkta çözeltiler kullanılır. Analizlerde kullanılacak su, TS EN ISO 3696'da tanımlanmıştır.

2.1. Sodyum klorür çözeltisi (%2 ağırlık/hacim): 1 litre çözelti hazırlamak için, 20 g sodyum klorür tartılır ve 1 litre su içinde çözülür.

3. Araç ve gereçler

Genel olarak kullanılan laboratuvar cihazları ve ayrıca aşağıdaki araç gereçler kullanılır:

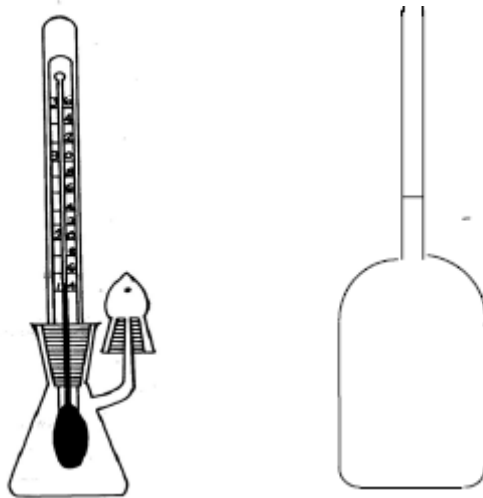
3.1. 0,1 mg hassasiyette analitik terazi

3.2. Şilifli, 10 °C'den 30 °C'ye kadar 0,1 hassasiyetle derecelendirilmiş termometre. Bu termometre sertifikalı ya da sertifikalı bir termometre ile kalibre edilmiş olmalıdır.

3.3. Yaklaşık 100 mL kapasiteli, şilifli olarak tutturulmuş, çıkarılabilir özellikte bir termometreli (3.2) sığağa dayanıklı cam piknometre (Şekil 2). Piknometre, 25 mm uzunluğunda ve iç çapı 1 mm (en fazla) olan, konik şilifli bir yan tüpe sahiptir. Eğer uygunsa TS ISO 3507'de tarif edilen biçimdeki diğer piknometreler de kullanılabilir (örneğin 50 mL).

3.4. Piknometre ile aynı dış hacme sahip (1 mL toleransla) ve özgül ağırlığı 1,01 olan bir sıvıyla (sodyum klorür çözeltisi, 2.1.) doldurulmuş piknometrenin kütlesine eşit bir kütleye sahip bir dara şişesi.

3.5. Piknometrenin gövdesini tam olarak saran ısı yalıtımlı bir kap



Şekil 2. Piknometre ve darası

4. İşlem

Ön bilgi:

Bu işlem alkol miktarının belirlenmesi için 100 mL'lik piknometre kullanımını tarif eder. Bu en iyi doğruluğu verir. Ancak, 50 mL gibi daha küçük hacimli piknometre kullanımı da mümkündür.

4.1. Piknometrenin kalibrasyonu

Piknometre aşağıdaki parametrelerin belirlenmesi ile kalibre edilir:

- Boş piknometrenin darası
- 20 °C'de piknometrenin hacmi
- 20 °C'de su ile dolu piknometrenin kütlesi

4.1.1. Tek kefeli terazi kullanılarak kalibrasyon

- Temiz ve kuru piknometrenin kütlesi, (P)
- t °C'de su ile dolu piknometrenin kütlesi, (P1)
- Dara şişesinin kütlesi, (T0), belirlenir.

4.1.1.1. Temiz ve kuru piknometre tartılır. (P)

4.1.1.2. Piknometre, ortam sıcaklığında distile su ile dikkatlice doldurulur ve termometre sabitlenir. Dikkatlice piknometre silinerek kurulanır ve ısı yalıtımlı kap içerisine yerleştirilir. Termometrenin sıcaklığı sabit okumaya gelene kadar, kap alt üst edilerek karıştırılır. Yan tüpün üst kısmındaki seviye çizgisinden dışarı çıkmayacak şekilde, piknometre ayarlanır. t °C sıcaklık dikkatlice okunur ve gerekiyor ise sıcaklık skalasındaki herhangi bir hata için düzeltme yapılır. Daha sonra su ile dolu piknometre tartılır.(P1)

4.1.1.3. Dara şişesi tartılır. (T0)

4.1.1.4. Hesaplama:

- Boş piknometrenin darası = P - m
m; piknometredeki havanın kütlesi
 $m = 0,0012 \times (P1 - P)$

Not: 0,0012; 20 °C'de ve 760 mm Hg basınçta kuru havanın yoğunluğudur.

- 20 °C'de piknometrenin hacmi

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

F_t; Tablo-2'den alınan t °C sıcaklık için faktördür.

V_{20°C}, 0,001 mL hassasiyetinde olmalıdır.

Tablo-2

F faktörleri

(20 °C'de piknometre hacmini hesaplamak için; t °C'deki piknometrenin içerdiği suyun kütlesi bu faktörle çarpılır)

t °C	F	t °C	F	t °C	F	t °C	F	t °C	F	t °C	F	t °C	F
10,0	1,000398	13,0	1,000691	16,0	1,001097	19,0	1,001608	22,0	1,002215	25,0	1,002916	28,0	1,003704
,1	1,000406	,1	1,000703	,1	1,001113	,1	1,001627	,1	1,002238	,1	1,002941	,1	1,003731
,2	1,000414	,2	1,000714	,2	1,001128	,2	1,001646	,2	1,002260	,2	1,002966	,2	1,003759
,3	1,000422	,3	1,000726	,3	1,001144	,3	1,001665	,3	1,002282	,3	1,002990	,3	1,003787
,4	1,000430	,4	1,000738	,4	1,001159	,4	1,001684	,4	1,002304	,4	1,003015	,4	1,003815
10,5	1,000439	13,5	1,000752	16,5	1,001175	19,5	1,001703	22,5	1,002326	25,5	1,003041	28,5	1,003843

,6	1,000447	,6	1,000764	,6	1,001191	,6	1,001722	,6	1,002349	,6	1,003066	,6	1,003871
,7	1,000456	,7	1,000777	,7	1,001207	,7	1,001741	,7	1,002372	,7	1,003092	,7	1,003899
,8	1,000465	,8	1,000789	,8	1,001223	,8	1,001761	,8	1,002394	,8	1,003117	,8	1,003928
,9	1,000474	,9	1,000803	,9	1,001239	,9	1,001780	,9	1,002417	,9	1,003143	,9	1,003956
11,0	1,000483	14,0	1,000816	17,0	1,001257	20,0	1,001800	23,0	1,002439	26,0	1,003168	29,0	1,003984
,1	1,000492	,1	1,000829	,1	1,001273	,1	1,001819	,1	1,002462	,1	1,003194	,1	1,004013
,2	1,000501	,2	1,000842	,2	1,001290	,2	1,001839	,2	1,002485	,2	1,003222	,2	1,004042
,3	1,000511	,3	1,000855	,3	1,001306	,3	1,001859	,3	1,002508	,3	1,003247	,3	1,004071
,4	1,000520	,4	1,000868	,4	1,001323	,4	1,001880	,4	1,002531	,4	1,003273	,4	1,004099
11,5	1,000530	14,5	1,000882	17,5	1,001340	20,5	1,001900	23,5	1,002555	26,5	1,003299	29,5	1,004128
,6	1,000540	,6	1,000895	,6	1,001357	,6	1,001920	,6	1,002578	,6	1,003326	,6	1,004158
,7	1,000550	,7	1,000909	,7	1,001374	,7	1,001941	,7	1,002602	,7	1,003352	,7	1,004187
,8	1,000560	,8	1,000923	,8	1,001391	,8	1,001961	,8	1,002625	,8	1,003379	,8	1,004216
,9	1,000570	,9	1,000937	,9	1,001409	,9	1,001982	,9	1,002649	,9	1,003405	,9	1,004245
12,0	1,000580	15,0	1,000951	18,0	1,001427	21,0	1,002002	24,0	1,002672	27,0	1,003432	30,0	1,004275
,1	1,000591	,1	1,000965	,1	1,001445	,1	1,002023	,1	1,002696	,1	1,003458		
,2	1,000601	,2	1,000979	,2	1,001462	,2	1,002044	,2	1,002720	,2	1,003485		
,3	1,000612	,3	1,000993	,3	1,001480	,3	1,002065	,3	1,002745	,3	1,003513		
,4	1,000623	,4	1,001008	,4	1,001498	,4	1,002086	,4	1,002769	,4	1,003540		
12,5	1,000634	15,5	1,001022	18,5	1,001516	21,5	1,002107	24,5	1,002793	27,5	1,003567		
,6	1,000645	,6	1,001037	,6	1,001534	,6	1,002129	,6	1,002817	,6	1,003594		
,7	1,000656	,7	1,001052	,7	1,001552	,7	1,002151	,7	1,002842	,7	1,003621		
,8	1,000668	,8	1,001067	,8	1,001570	,8	1,002172	,8	1,002866	,8	1,003649		
,9	1,000679	,9	1,001082	,9	1,001589	,9	1,002194	,9	1,002891	,9	1,003676		

- 20 °C'de piknometredeki suyun kütlesi

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

0,998203; 20 °C'de suyun yoğunluğudur.

Not: Gerekli ise suyun havadaki yoğunluğu olan 0,99715 değeri kullanılabilir ve HMCE Tablolarında bu yoğunluğa karşılık gelen referans ile alkol miktarı hesaplanır.

4.1.2. İki kefli terazi kullanılarak kalibrasyon metodu

4.1.2.1. Terazinin sol kefesine dara şişesi ve sağ kefesine toplayıcı kapağı ile birlikte temiz, kuru piknometre yerleştirilir. Piknometre tarafına ağırlıklar eklenerek (p gram) denge sağlanır.

4.1.2.2. Ortam sıcaklığında piknometre distile su ile doldurulur ve termometre sabitlenir. Piknometre silinerek kurulur ve ısı yalıtımlı kap içerisinde yerleştirilir. Termometrenin sıcaklığı sabit okumaya gelene kadar kap alt-üst edilerek karıştırılır. Yan tüpün üst kısmındaki seviye çizgisine ayarlama yapılır. Yan tüp temizlenir, toplayıcı kapak sabitlenir, t °C sıcaklık dikkatlice okunur ve gerekiyor ise sıcaklık skalasındaki herhangi bir hata için düzeltme yapılır. Daha sonra su ile dolu piknometre tartılır [p',(g)].

4.1.2.3. Hesaplama:

- Boş piknometrenin darası = p + m

m; piknometredeki havanın kütlesi

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

- 20 °C'de piknometrenin hacmi

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

F_t ; Tablo-2'den alınan t °C sıcaklık için faktördür.

$V_{20^{\circ}C}$, 0,001 mL hassasiyetinde olmalıdır.

- 20 °C'de piknometredeki suyun kütlesi

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

0,998203; 20 °C'de suyun yoğunluğudur.

4.2. Numunenin alkol miktarının belirlenmesi

4.2.1. Tek kefeli terazi kullanılarak:

4.2.1.1. Dara şişesi tartılır. (T1)

4.2.1.2. Hazırlanan distilat (Bölüm 1) ile piknometre tartılır (t °C'de ağırlığı P2).

4.2.1.3. Hesaplama

- $dT = T1 - T0$
- Ölçüm anında boş piknometrenin kütlesi = $P - m + dT$
- t °C'de piknometredeki sıvının kütlesi = $P2 - (P - m + dT)$
- t °C'de g/mL olarak yoğunluk
- $P_{t^{\circ}C} = [P2 - (P - m + dT)] / V_{20^{\circ}C}$
- Yoğunluk; $\rho_{t^{\circ}C}$ değeri 1000 ile çarpılarak, t °C'de kg/m^3 olarak ifade edilir ve değer ρ_t olarak bilinir.
- Alkol-su karışımları için ρ_T yoğunlukları tablosu (OIV, analiz metotları kılavuzu, 1. Cilt Ek-II/Tablo-II, sayfa 11, 2012) kullanılarak ρ_t , 20 °C'ye düzeltilir.
- Tabloda, t °C sıcaklık değerinin hemen altındaki tam sayı sıcaklık değerindeki T sıcaklığına karşılık gelen yatay satır ve ρ_t 'nin üstündeki en küçük yoğunluk değeri bulunur. Bu yoğunluğun altında bulunan tablo farkı kullanılarak, T sıcaklıktaki distilatın ρ_t yoğunluğu hesaplanır.
- Sıcaklık satırı kullanılarak, ρ_t 'nin hemen üzerinde tabloda ρ' yoğunluğu ve hesaplanan ρ_t yoğunluğu arasındaki fark bulunur. Bu fark, ρ' yoğunluğunun sağında bulunan tablo farkı ile bölünür. Bu oran; alkol miktarının tamsayı kısmı ρ' yoğunluğunun bulunduğu kolonun üstünde bulunurken alkol miktarının ondalıklı kısmını verir. (Dt, alkol miktarı)

Not: Alternatif olarak piknometre işarete tamamlanana kadar 20 °C'deki ($\pm 0,2$ °C) su banyosunda bekletilir.

4.2.1.4. Sonuç

ρ_{20} yoğunluğu kullanıldığında, "Alkol Tabloları" yardımıyla gerçek alkol miktarı hesaplanır.

Alkol-su karışımlarının 20 °C'de yoğunluğunun fonksiyonu olarak 20 °C'de hacmen (%hacmen) alkol miktarının değerini veren "Alkol Tabloları", OIML tarafından kabul edilmiş olan uluslararası tablolarıdır (OIML 22 no'lu Tavsiye Kararı, 1975).

4.2.2. Tek kefeli terazi kullanılan metot

4.2.2.1. Hazırlanan distilat ile dolu olan piknometre tartılır; p'' , t °C'deki kütledir.

4.2.2.2. Hesaplama

- t °C'de piknometredeki sıvının kütlesi = $p + m - p''$
- t °C'de g/mL olarak yoğunluk; $P_{t^{\circ}C} = (p + m - p'') / V_{20^{\circ}C}$

Yoğunluk, t °C'de kg/m^3 olarak ifade edilir ve tek kefeli terazi kullanımında tarif edildiği gibi 20 °C'de alkol miktarını hesaplamak için sıcaklık düzeltilmesi yapılır.

5. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

5.1. Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metod performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 20

Numune sayısı 6

Numuneler	A	B	C	D	E	F
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	19	20	17	19	19	17
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	1	–	2	1	1	3
Kabul edilen sonuç sayısı	38	40	34	38	38	34
Ortalama değer (\bar{X}), (%hacmen)	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51*			42,93*	45,73*	63,03*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r) (% hacmen)	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Tekrar edilebilirlik sınırı (% hacmen) (r)	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R) (%hacmen)	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Laboratuvarlararası yeniden üretilebilirlik sınırı (% hacmen) (R)	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90
Numune türleri						
A Meyve likörü; split oranı (*)						
B Brendi; kör tekrarlar						
C Viski; kör tekrarlar						
D Grappa; split oranı (*)						
E Aquavit; split oranı (*)						
F Rom; split oranı (*)						

Metot B: Distile Alkollü İçkilerin Hacmen Gerçek Alkol Miktarının Belirlenmesi – Elektronik Dansimetre İle Ölçüm (Osilasyon Hücresindeki Numunenin Rezonant Sıklık Salınımına Dayalı Ölçüm)

1. Prensip

Sıvının yoğunluğu, titreşen U-tüpünün salınımlarının elektronik ölçümü ile belirlenir. Bu ölçümü gerçekleştirmek için; numune, bir salınım sistemine eklenir. Böylece, sistemin spesifik salınım sıklığı, kütlelenin eklenmesi ile değişir.

2. Reaktifler

Analizlerde aksi belirtilmedikçe, yalnızca analitik saflıkta çözeltiler ve en az TS EN ISO 3696'da tanımlanan sınıf 3 su kullanılır.

- Aseton ya da mutlak alkol (hacmen %100'lük etil alkol).

- Kuru hava

3. Araç ve gereçler

Genel olarak kullanılan laboratuvar cihazları ve ayrıca aşağıdaki araç gereçler kullanılır:

3.1. Dijital görüntülü dansimetre

Bu tür ölçümleri gerçekleştirmek için kullanılan elektronik dansimetre, yoğunluğu 5 ondalıklı olarak g/mL cinsinden ifade edebilmelidir.

Not: Dansimetre, tüm titreşimlerden izole edilmiş çok iyi sabitlenmiş bir stand üzerine yerleştirilmelidir.

3.2. Sıcaklık düzenlemesi

Dansimetrenin performansı, sadece ölçüm hücresi $\pm 0,02$ °C ya da daha hassas sapma ile aynı sıcaklık stabilitesini mümkün kılabilen sabit sıcaklık düzenleyicisine bağlı ise geçerlidir.

Not: Ölçüm hücresinde sıcaklığın doğru ayarlanması ve izlenmesi çok önemlidir. 0,1 °C'lik bir hata, yoğunlukta 0,1 kg/m³ (0,0001 g/mL) bir sapmaya neden olabilir.

3.3. Numune enjeksiyon şırıngaları ya da otomatik örnekleyici.

4. İşlem

4.1. Dansimetrenin kalibrasyonu

Dansimetre ilk kullanımında talimatına göre kalibre edilmelidir. Düzenli olarak tekrar kalibre edilmeli ve sertifikalı referans standarda ya da sertifikalı referans standart bazlı iç laboratuvar referans çözeltilisine karşı kontrol edilmelidir.

4.2. Numune yoğunluğunun belirlenmesi

4.2.1. Ölçüm öncesinde gerekli ise; hücre, aseton ya da mutlak alkol ve kuru hava ile temizlenir ve kurulanır. Hücre, numune ile çalkalanır.

4.2.2. Şırınga ya da örnekleyici kullanılarak tamamen dolacak şekilde hücreye numune enjekte edilir. Bu işlem sırasında, hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırıldığından emin olunmalıdır. Numune homojen olmalıdır ve katı partiküller içermemelidir. Analiz öncesinde, herhangi bir partikül filtrasyon gibi işlemlerle uzaklaştırılmalıdır.

4.2.3. Okuma sabitlendikten sonra, ρ_{20} yoğunluğu ya da dansimetre ile gösterilen alkol miktarı kaydedilir.

4.3. Sonuç

ρ_{20} yoğunluğu kullanıldığında, "Alkol Tabloları" yardımıyla gerçek alkol miktarı hesaplanır.

Alkol-su karışımlarının 20 °C'de yoğunluğunun fonksiyonu olarak 20 °C'de hacmen (% hacmen) alkol miktarının değerini veren "Alkol Tabloları", OIML tarafından kabul edilmiş olan uluslararası tablolarıdır (OIML 22 no'lu Tavsiye Kararı, 1975).

5. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

5.1. Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metot performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 16

Numune sayısı 6

Numuneler	A	B	C	D	E	F
Aykırı değer gösteren laboratuvarların	11	13	15	16	14	13

çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı						
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	2	3	1	-	1	2
Kabul edilen sonuç sayısı	22	26	30	32	28	26
Ortalama değer (\bar{x}), (%hacmen)	23,81 26,52*	40,12	40,35	39,27 43,10*	42,39 45,91*	56,99 63,31*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r) (% hacmen)	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Tekrar edilebilirlik sınırı (%hacmen) (r)	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R) (%hacmen)	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Laboratuvarlararası yeniden üretilebilirlik sınırı (%hacmen) (R)	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58
Numune türleri						
A Meyve likörü; split oranı (*)						
B Brendi; kör tekrarlar						
C Viski; kör tekrarlar						
D Grappa; split oranı (*)						
E Aquavit; split oranı (*)						
F Rom; split oranı (*)						

Metot C: Distile Alkollü İçkilerin Hacmen Gerçek Alkol Miktarlarının Belirlenmesi – Hidrostatik Terazi Kullanılarak Dansimetre ile Ölçüm

1. PrensiP

Distile alkollü içkilerin alkol miktarı Arşimet prensibine (Bir sıvının içine batırılan kütle, içine konduğu sıvının ağırlığına eşit miktarda sıvının yükselmesine sebep olur.) dayanan hidrostatik terazi kullanılarak dansimetre ile ölçülebilir.

2. Reaktifler

Analizlerde aksi belirtilmedikçe, yalnızca analitik saflıkta çözeltiler ve en az TS EN ISO 3696'da tanımlanan sınıf 3 su kullanılır.

- Dansimetre temizleme çözeltisi (sodyum hidroksit, %30 ağırlık/hacim)

100 mL çözelti hazırlamak için; 30 g sodyum hidroksit tartılır ve hacmen % 96'lık etil alkol ile 100 mL'ye tamamlanır.

3. Araç ve gereçler

Genel olarak kullanılan laboratuvar cihazları ve ayrıca aşağıdaki araç gereçler kullanılır:

3.1. Tek kefeli hidrostatik terazi (1 mg ölçüm hassasiyetinde)

3.2. En az 20 mL hacimli dansimetre (teraziye göre özel olarak adapte edilmiş ve çapı 0,1 mm'yi geçmeyen bir iple asılı)

3.3. Seviye işareti taşıyan bir ölçü silindiri (Dansimetrenin, işaretin altına yerleştirilmiş silindirin hacmine tamamen sığabilecek durumda olması gerekir. İp yardımıyla dansimetre sıvının içine daldırılır. Ölçü silindirinin iç çapı dansimetrenin çapından en az 6 mm daha geniş olmalıdır.)

3.4. Termometre ya da sıcaklık ölçer sonda (10 °C'den 40 °C' ye kadar onarlı olarak derecelenmiş ve 0,05 °C'ye kalibre edilmiş)

3.5. Ağırlıklar (yetkili bir sertifikalandırma kuruluşu tarafından kalibre edilmiş)

Not: OIV analiz metotlarının "20 °C' de Yoğunluk ve Özgül Ağırlık Analizi" başlıklı (OIV, analiz metotları kılavuzu, 1. Cilt Bölüm-II/Tip 1 Metodu, sayfa 20, 2012) metodunda tarif edilen prensip ile iki kefeli terazi kullanımı da mümkündür.

4. İşlem

Dansimetre ve ölçü silindiri her ölçüm arasında distile suyla temizlenmeli, yumuşak kurutma kâğıdıyla kurulanmalı ve yoğunluğu belirlenecek çözeltiyle çalkalanmalıdır. Evaporasyon ile alkol kaybını engellemek için düzenek stabil duruma geldikten hemen sonra ölçümler yapılmalıdır.

4.1. Terazinin kalibrasyonu

Her ne kadar terazilerin genelde iç kalibrasyon sistemleri olsa da, hidrostatik terazilerin yetkili bir sertifikalandırma kuruluşu tarafından kontrol edilmiş ağırlıklarla kalibre edilmesi gereklidir.

4.2. Dansimetrenin kalibrasyonu

4.2.1. Ölçü silindiri, 15 °C – 25 °C arasındaki, ancak tercihen 20 °C'deki, iki kere distile edilmiş suyla (ya da eşit saflıkta suyla, 18,2 MΩ/cm iletkenliğe sahip mikrofiltre edilmiş su) işarete kadar doldurulur.

4.2.2. Dansimetre ve termometre daldırılır, karıştırılır ve düzenekten sıvının yoğunluğu okunur. Gerekirse ölçüm sıcaklığındaki suyun yoğunluğuna göre yoğunluk düzeltilmesi yapılır.

4.3. Alkol-su çözeltisi kullanılarak yapılan kontrol

4.3.1. Ölçü silindiri, 15 °C - 25 °C arasındaki, ancak tercihen 20 °C'deki, hacmen alkol miktarı bilinen alkol-su karışımı ile işarete kadar doldurulur.

4.3.2. Dansimetre ve termometre daldırılır, karıştırılır ve düzenekten sıvının yoğunluğu (ya da mümkünse alkol miktarı) okunur. Okunan alkol miktarı, daha önceden bilinen alkol miktarına eşit olmalıdır.

Not: Dansimetreyi kalibre etmek için iki kere distile edilmiş su yerine alkol miktarı bilinen bu çözelti de kullanılabilir.

4.4. Distilatın yoğunluğunun (ya da düzenek olanak sağlıyorsa alkol miktarının) ölçümü

4.4.1. Numune, ölçü silindirinin derecelendirme işaretine kadar doldurulur.

4.4.2. Dansimetre ve termometre daldırılır, karıştırılır ve düzenekten sıvının yoğunluğu (ya da mümkünse alkol miktarı) okunur. Eğer yoğunluk t °C'de ölçüldüyse; ρ_t sıcaklık not edilir.

4.4.3. Alkol-su karışımları için ρ_t yoğunlukları tablosu kullanılarak ρ_t , 20°C'ye düzeltilir (OIV, analiz metotları kılavuzu, 1. Cilt Ek-II/Tablo-II, sayfa 11, 2012)

4.5. Dansimetrenin ve ölçü silindirin temizlenmesi

4.5.1. Dansimetre, ölçü silindirin içindeki dansimetre temizleme çözeltisi içine daldırılır.

4.5.2. Bir saat boyunca dansimetre düzenli aralıklarla çevrilerek ıslanması sağlanır.

4.5.3. Önce bol miktarda musluk suyuyla, daha sonra da distile suyla durulanır.

4.5.4. Kurutma kâğıdıyla kurulanır. Bu işlem, dansimetrenin ilk kullanımında ve daha sonra da gerekli sıklıkta gerçekleştirilir.

4.6. Sonuç

ρ_{20} yoğunluğu kullanıldığında, "Alkol Tabloları" yardımıyla gerçek alkol miktarı hesaplanır.

Alkol-su karışımlarının 20 °C'de yoğunluğunun fonksiyonu olarak 20 °C'de hacmen (% hacmen) alkol miktarının değerini veren "Alkol Tabloları", OIML tarafından kabul edilmiş olan uluslararası tablolar (OIML 22 no'lu Tavsiye Kararı, 1975).

5. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

5.1. Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metot performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 12

Numune sayısı 6

Numuneler	A	B	C	D	E	F
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	12	10	11	12	11	9
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	-	2	1	-	1	2
Kabul edilen sonuç sayısı	24	20	22	24	22	18
Ortalama değer (\bar{x}), (% hacmen)	23,80 26,51*	40,09	40,29	39,26 43,09*	42,38 45,89*	57,16 63,44*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r) (% hacmen)	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Tekrar edilebilirlik sınırı (% hacmen) (r)	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R) (% hacmen)	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Laboratuvarlararası yeniden üretilebilirlik sınırı (% hacmen) (R)	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Numune türleri

A Meyve likörü; split oranı (*)

B Brendi; kör tekrarlar

C Viski; kör tekrarlar

D Grappa; split oranı (*)

E Aquavit; split oranı (*)

F Rom; split oranı (*)

Ek-2

GRAVİMETRİK METOTLA TOPLAM KURU MADDENİN BELİRLENMESİ

1. Kapsam

Bu metot, yalnızca Distile Alkollü İçkiler Tebliği'nde geçen 15 g/L ile sınırlı kuru madde içeren "akvavit" veya "aquavit"ler için kullanılır.

2. Tanım

Toplam kuru madde, belirli fiziksel koşullar altında uçucu olmayan bütün maddeleri içerir.

Analizlerde kullanılacak su, TS EN ISO 3696'da tanımlanmıştır.

3. Prensip

Gravimetrik yolla gerçekleştirilen bu metodun prensibi, kaynayan su banyosunda distile alkollü içkinin evaporasyonu ve etüvde kurutulması ile ayrılan kalıntıların tartımına dayanır.

4. Araç ve gereçler

4.1. Düz tabanlı, 55 mm çapına sahip silindirik evaporasyon kabı

4.2. Kaynar su banyosu

4.3. A sınıfı 25 mL'lik pipet

4.4. Etüv

4.5. Desikatör

4.6. 0,1 mg hassasiyetinde analitik terazi

5. Numuneler

Numuneler analiz öncesi oda sıcaklığında saklanır.

6. İşlem

6.1. Önceden tartılmış evaporasyon kabına kuru madde miktarı 15 g/L'den az olan numuneden 25 mL aktarılır. Evaporasyonun birinci saati sırasında, sıçramalar nedeniyle kayıplar olabileceği için sıvının kaynamaması için evaporasyon kabı kaynar su banyosunun kapağının üzerine yerleştirilir. Bir saat daha kaynar su banyosunun buharı ile doğrudan temasa bırakılır.

6.2. Evaporasyon kabı daha sonra 105 ± 3 °C'de 2 saat etüvde tamamen kurutulur. Evaporasyon kabı desikatörde soğumaya bırakılır ve içeriği ile birlikte kap tartılır.

7. Hesaplama

Kalıntının kütlesi 40 ile çarpıldığında, distile alkollü içkideki kuru madde miktarına eşittir ve g/L cinsinden tek ondalıklı olarak ifade edilir.

8. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

8.1. Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metot performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 10

Numuneler	A	B	C	D
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	9	9	8	9
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	1	1	2	-
Kabul edilen sonuç sayısı	18	18	16	18
Ortalama değer (\bar{X}), (% hacmen)	9,0	9,1 7,8	10,0 9,4	11,8 11,1
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r) (% hacmen)	0,075	0,441	0,028	0,123
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Tekrar edilebilirlik sınırı (% hacmen) (r)	0,2	1,2	0,1	0,3
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R) (%hacmen)	0,148	0,451	0,058	0,210
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Laboratuvarlar arası yeniden üretilebilirlik sınırı (% hacmen) (R)	0,4	1,3	0,2	0,6
Numune türleri A Brendi; kör tekrarlar B Rom; split oranı C Grappa; split oranı D Aquavit; split oranı				

Ek-3

DİSTİLE ALKOLLÜ İÇKİLERİN METİL ALKOL VE UÇUCU BİLEŞİKLERİNİN BELİRLENMESİ

1. Genel hükümler

1.1. Tanımlar

Distile alkollü içkilerde etil alkol ve metil alkol dışındaki toplam uçucu bileşiklerin minimum miktarları Distile Alkollü İçkiler Tebliği'nde belirtilmiştir. Bu içkilerde toplam uçucu miktarı uçucu asitler, aldehitler, esterler ve yüksek alkollerin miktarlarının toplanmasıyla bulunur. Burada;

i) Uçucu asitler; asetik asit cinsinden ifade edilir.

ii) Aldehitler; asetaldehit (etanal) ve asetal (1,1-dietoksietan)'in toplamı olarak asetaldehit cinsinden ifade edilir.

iii) Yüksek alkoller; n-propanol, 2-bütanol (sekbütanol), izobütanol (2-metil-1-propanol), n-bütanol, aktif amil alkol (2-metil-1-bütanol) ve izoamil alkol (3-metil-1-bütanol) toplamı olarak izobütanol cinsinden ifade edilir. Amil alkoller; aktif amil alkol ve izoamil alkol'un toplamı olarak verilebilir.

iv) Esterler; etil asetat (etiletanoat) ve metil asetatın toplamı olarak etil asetat cinsinden ifade edilir.

Uçucu bileşiklerin analizi için uygulanan metotlar

a) Uçar asit tayini

b) GC metodu ile aldehit (etanal ve asetal), etil asetat ve yüksek alkollerin tayini

1.2. Uçucu bileşiklerin GC ile analizi

Yukarıda bahsedilenlerin haricindeki diğer uçucu bileşiklerin GC ile çalışılması, aynı zamanda distilasyonda kullanılan hammaddenin kaynağının belirlenmesinde ve distilasyon koşullarının saptanmasında kullanılabilir.

Bazı distile alkollü içkiler, aromatik bileşikler gibi diğer uçucu bileşikler içerir. Bu aromatik bileşikler; hazırlanan distile alkollü içkilerin hazırlanmasının özel şartları, distile alkollü içkilerin aromasının ve alkol eldesinde kullanılan ham maddenin karakteristiğini yansıtır. Bu bileşikler, Distile İçkiler Alkollü Tebliği'nde belirtilen hükümlerin değerlendirilmesinde önemlidir.

2. Aldehitler, yüksek alkoller, etil asetat ve metil alkolün GC ile analizi:

2.1. Kapsam

Bu metot, GC ile distile alkollü içkilerde bulunan aktif amil alkol, izoamil alkol, metil alkol (metanol), etil asetat, n-bütanol, 2-bütanol, izobütanol alkol, n-propanol ve asetaldehitin belirlenmesi için uygundur. Metotta 3-pentanol gibi bir iç standart kullanılır. Analitlerin konsantrasyonu; mutlak alkolün (hacmen %100 alkolde) 100 litresinde gram olarak ifade edilir. Bunun için numunedeki hacmen alkol miktarının önceden belirlenmesi gerekir.

2.2. Tanım

İçeriği oluşturan bu maddeler; distile alkollü içkilerde, fermentasyon, distilasyon ve olgunlaştırma sırasında etil alkol ile birlikte oluşan uçucu bileşiklerdir.

Analizlerde kullanılacak su, TS EN ISO 3696'da tanımlanmıştır.

2.3. Prensiptir

Distile alkollü içki numunesi GC'ye doğrudan enjekte edilerek (veya seyreltikten sonra) uçucu bileşikler belirlenir. Enjeksiyondan önce numune içerisine uygun bir iç standart (örneğin 3-pentanol) ilave edilir ve uçucu bileşikler uygun bir kolon ve sıcaklık programıyla birbirinden ayrılır ve alev iyonlaşma dedektöründe (FID) tespit edilir. Her bir uçucu bileşiğin konsantrasyonu, analiz edilen distile alkollü içki ile aynı kromatografik koşullarda kalibrasyonla elde edilen tepki faktörleri de dikkate alınarak hesaplanır.

2.4. Reaktifler ve materyaller

Aksi belirtilmedikçe yalnızca en az % 97 saflıkta çözeltiler olmalıdır. Asetaldehit ve asetal buzdolabında 5 °C'nin altında karanlıkta saklanmalıdır. Diğer kimyasal maddeler ise oda sıcaklığında saklanabilir. Tüm çözeltilerin hazırlanmasında ve GC analizlerinde ultra saf su (18,2 MΩ/cm iletkenliğe sahip mikrofiltre edilmiş su) kullanılır.

2.4.1. Mutlak (susuz) etil alkol (CAS 64-17-5)

2.4.2. Metil alkol (CAS 67-56-1)

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

2.4.4. 2-metilpropan-1-ol (CAS 78-33-1)

2.4.5. Uygun iç standartlar; pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-metilpentan-1-ol (CAS 626-89-1) veya metil nonanoat (CAS 1731-84-6)

2.4.6. 2-metilbütan-1-ol (CAS 137-32-6)

2.4.7. 3-metilbütan-1-ol (CAS 123-51-3)

2.4.8. Etil asetat (CAS 141-78-6)

2.4.9. Bütan-1-ol (CAS 71-36-3)

2.4.10. Bütan-2-ol (CAS 78-92-2)

2.4.11. Asetaldehit (CAS 75-07-0)

2.4.12. Asetal (CAS 105-57-7)

2.4.13. Hacmen %40'lık etil alkol çözeltisi (Bundan sonra sadece "etil alkol çözeltisi" olarak ifade edilecektir.)

1 litrelik balon jojeye 400 mL mutlak etil alkol alınır. Distile su ile 1 litreye tamamlanır ve karıştırılır.

2.4.14. Standart çözeltilerin hazırlanması ve saklanması (Geçerli kılınmış metot için kullanılan prosedür):

Tüm standart çözeltiler buzdolabında 5 °C'nin altında saklanmalıdır ve her ay tekrar hazırlanmalıdır. Bileşen ve çözeltilerin kütleleri, 0,1 mg hassasiyette kayıt edilmiş olmalıdır.

2.4.14.1. Standart çözelti - A

100 mL'lik balon joje içerisine, bileşen evaporasyonunu önlemek için 60 mL etil alkol çözeltisi ilave edilir ve üzerine aşağıdaki reaktiflerden 3'er mL konular ve etil alkol çözeltisiyle 100 mL'ye tamamlanarak iyice karıştırılır. Balonun darası, ilave edilen her bir bileşiğin ağırlığı ve son ağırlık kaydedilir.

Bileşen	Hacim (mL)
Metil alkol (2.4.2)	3,0
Propan-1-ol (2.4.3)	3,0
2-metilpropan-1-ol (2.4.4)	3,0
2-metilbütan-1-ol (2.4.6)	3,0
3-metilbütan-1-ol (2.4.7)	3,0
Etil asetat (2.4.8)	3,0
Bütan-1-ol (2.4.9)	3,0
Bütan-2-ol (2.4.10)	3,0
Asetaldehit (2.4.11)	3,0
Asetal (2.4.12)	3,0

Not: Evaporasyonla oluşan kaybı en aza indirmek için, asetal ve asetaldehit en son ilave edilir.

2.4.14.2. Standart çözelti - B

100 mL balon joje içerisine 80 mL etil alkol çözeltisi ilave edilir ve üzerine iç standart olarak kullanılacak 3 mL pentan-3-ol veya başka bir uygun iç standart ilave edilir. Etil alkol çözeltisiyle 100 mL'ye tamamlanır ve iyice karıştırılır. Balonun darası, ilave edilen pentan-3-ol (veya başka bir iç standart)'ün ağırlığı ve son ağırlık kaydedilir.

2.4.14.3. Standart çözelti - C

100 mL'lik balona 80 mL etil alkol çözeltisi alınır ve üzerine 1 mL Standart çözelti - A (2.4.14.1) ve 1 mL Standart çözelti - B (2.4.14.2) ilave edilir. Etil alkol çözeltisiyle 100 mL'ye tamamlanır ve iyice karıştırılır. Balonun darası, ilave edilen her çözeltinin ağırlığı ve son ağırlık kaydedilir.

2.4.14.4. Standart çözelti - D

Analizlerde sürekliliği sağlamak için, önceden hazırlanmış Standart çözelti – A (2.4.14.1) kullanılarak bir kalite kontrol standart çözeltisi hazırlanır. 100 mL'lik balona 80 mL etil alkol çözeltisi alınır ve üzerine 1 mL Standart çözelti – A'dan ilave edilir. Etil alkol çözeltisiyle 100 mL'ye tamamlanır ve iyice karıştırılır. Balonun darası, ilave edilen her bileşenin ağırlığı ve son ağırlık kaydedilir.

2.4.14.5. Standart çözelti - E

100 mL'lik balon joje içerisine 80 mL etil alkol çözeltisi ilave edilir ve üzerine 10 mL Standart çözelti - B (2.4.14.2) konulur. Etil alkol çözeltisiyle 100 mL'ye tamamlanır ve iyice karıştırılır. Balonun darası, ilave edilen her bileşenin ağırlığı ve son ağırlık kaydedilir.

2.4.14.6. FID'in tepki doğrusallığını kontrol etmek için kullanılan standart çözeltiler

Beş ayrı 100 mL'lik balona 80 mL etil alkol çözeltisi ilave edildikten sonra her bir balona 0 - 0,1 - 0,5 - 1,0 ve 2,0 mL Standart çözelti – A (2.4.14.1) ve 1 mL Standart çözelti – B (2.4.14.2) ilave edilir. Etil alkol çözeltisiyle 100 mL'ye tamamlanır ve iyice karıştırılır. Balonun darası, ilave edilen her bileşenin ağırlığı ve son ağırlık kaydedilir.

2.4.14.7. Kalite kontrol standart çözeltisi

Bir tartı kabı içerisine pipetle Standart çözelti – D (2.4.14.4)'den 9 mL ve üzerine Standart çözelti – E (2.4.14.5)'den 1 mL alınır ve iyice karıştırılır. Kabın darası, ilave edilen her bileşenin ağırlığı ve son ağırlık kaydedilir.

2.5. Araç ve gereçler

2.5.1. Yoğunluk ve hacmen alkol miktarını ölçmeye yarayan cihazlar

2.5.2. Analitik terazi (4 ondalıklı hassasiyette tartım yapabilen)

2.5.3. GC – FID'a bağlı, fırın sıcaklığı programlanabilen, pik alanını veya yüksekliğini ölçebilen bilgisayar programına sahip.

2.5.4. En azından Madde 1.1.'in (iii) bendinde belirtilen analitleri (2-metilbütan-1-ol ve 3-metilbütan-1-ol hariç) birbirinden ayırabilen GC kolonu.

Not: Analize uygun bazı örnek kolon ve GC koşulları aşağıda verilmiştir.

1. CP-WAX 57CB kolonuna bağlı (50 m uzunluk ve 0,32 mm iç çap ve 0,2 µm film kalınlığı, polietilen glikol sabit fazlı) 1 m uzunlukta ve 0,32 mm iç çapında bir ön kolon (gard kolon) ve bu kolona bağlı Carbowax 400 kolonu (50 m ve 0,32 mm iç çap, 0,2µm film kalınlığı). Kolonlar presle geçirilmiş bağlayıcı ile birbirine bağlanır.

Taşıyıcı gaz ve basınç: Helyum (135 kPa)

Kolon sıcaklığı: 35 °C'de 17 dakika, 35 °C'den 70 °C'ye kadar 12 °C/dk artış, 70 °C'de 25 dakika bekleme.

Enjektör sıcaklığı: 150 °C

Dedektör sıcaklığı 250 °C

Enjeksiyon miktarı: 1 µL, split 20 den 100:1'e kadar.

2. CP- WAX 57 CB kolonuna bağlı (50 m ve 0,2 µm film kalınlığına sahip, polietilen glikol sabit fazlı)1 m uzunlukta ve 0,32 mm iç çapta bir ön kolon. Ön kolon presle geçirilmiş bağlayıcı ile birbirine bağlanır.

Taşıyıcı gaz ve basınç: Helyum (65 kPa)

Kolon Sıcaklığı: 35 °C'de 10 dakika, 35 °C'den 110 °C'ye kadar 5 °C/dk artış, 110 °C'den 190 °C'ye kadar 30 °C/dk artış ve 190 °C'de 2 dakika bekleme.

Enjektör sıcaklığı: 260 °C

Dedektör sıcaklığı: 300 °C

Enjeksiyon hacmi: 1µL, split 55:1

3. Dolgulu kolon (%5 CW 20M; Carbopak B) (2 m uzunluk ve 2 mm iç çap)

Kolon sıcaklığı: 65 °C'de 4 dakika, 65 °C'den 140 °C'ye kadar 10 °C/dk artış, 140 °C'de 5 dakika bekleme, 140 °C'den 150 °C'ye kadar 5 °C/dk artış, 150 °C'de 3 dakika bekleme.

Enjektör sıcaklığı: 65 °C

Dedektör sıcaklığı: 200 °C

Enjeksiyon hacmi: 1µL

2.6. Numune

2.6.1. Laboratuvar numunesi:

Analize başlamadan önce numunenin hacmen alkol miktarı belirlenir(2.5.1).

2.7. İşlem

Uçucu maddeler ile çalışıldığı için dara alma işlemi de dahil olmak üzere her madde ilavesinden sonra tartı kabının kapağı kapalı tutulmalıdır.

2.7.1. Test kısmı

2.7.1.1. Tartı kabı darası belirlenir ve ağırlık kaydedilir.

2.7.1.2. Tartı kabı içerisine 9 mL numune alınır ve ağırlık kaydedilir (M_{numune}).

2.7.1.3. Üzerine 1 mL Standart çözelti -E (2.4.14.5)'den eklenir ve ağırlık kaydedilir ($M_{iç\ standart}$).

2.7.1.4. Analiz numunesi şiddetli bir şekilde karıştırılır (en az 20 kez çevrilir). Numuneler analiz öncesi uçucu kaybını minimize etmek için 5 °C'nin altında saklanmalıdır.

2.7.2. Kör deneme

2.7.2.1. 4 ondalıklı hassasiyete sahip hassas terazi kullanılarak tartı kabının darası alınır ve ağırlık kaydedilir.

2.7.2.2. Tartı kabı içerisine 9 mL etil alkol çözeltisi (2.4.13) alınır ve ağırlık kaydedilir.

2.7.2.3. Standart çözelti – E (2.4.14.5)'den 1 mL ilave edilir ve ağırlık kaydedilir.

2.7.2.4. Numune şiddetli bir şekilde karıştırılır (an az 20 kez çevrilir). Numuneler analiz öncesi uçucu kaybını minimize etmek için 5 °C'nin altında saklanmalıdır.

2.7.3. Ön test

Madde 1.1.'in (iii) bendinde belirtilen tüm analitlerin (2-metilbütan-1-ol ve 3-metilbütan-1-ol hariç) kolonda iyi bir şekilde ayrılmalarını sağlamak için Standart çözelti – C (2.4.14.3), GC'ye enjekte edilir.

2.7.4. Kalibrasyon

Kalibrasyon aşağıdaki işlemle kontrol edilir:

İç standart (IS) içeren doğrusallık standart çözeltilerinin (2.4.14.6) her biri, 3 tekerrürlü analiz edilerek, doğrusal tepki sağlanır. Her bir enjeksiyonda her bir bileşen için elde edilen alan iç standardın alanına oranlanarak R değeri bulunur. Her bir bileşenin konsantrasyonunun iç standardın (IS) konsantrasyonuna oranı da C olarak ifade edilir. R ile C arasındaki korelasyon katsayısı en az 0.99 olmalıdır.

$R = \text{Bileşenin pik alanı} / \text{İç standardın pik alanı}$

$C = \text{Bileşenin konsantrasyonu} (\mu\text{g/g}) / \text{İç standardın konsantrasyonu} (\mu\text{g/g})$

2.7.5. Belirleme

Standart çözelti – C'den (2.4.14.3) enjekte edilir ve iki defa kalite kontrol standart çözeltilerinden (2.4.14.7) enjekte edilir. Ardından bilinmeyen her 10 numune (2.7.1 ve 2.7.2'ye göre hazırlanan) enjeksiyonundan sonra bir defa kalite kontrol standart çözeltileri enjekte edilir. Her 5 numuneden sonra da bir defa Standart çözelti - C (2.4.14.3) enjekte edilir.

2.8. Hesaplama

Cihazla yapılan işlemlerde otomatik olarak elde edilen sonuçlar aşağıda prensibi verilen metot ile kontrol edilebilir. Her bir bileşenin ve iç standardın pik alanları ya da pik yüksekliği ölçülür.

2.8.1. Tepki faktörünün hesaplanması

Standart çözelti – C'den (2.4.14.3) enjekte edilir ve her bir bileşenin pik alanı hesaplanır. Daha sonra her bir bileşen için aşağıdaki formül kullanılarak tepki faktörü hesaplanır.

Formül (1);

Tepki faktörü (RF)=[İç standardın pik alanı ya da yüksekliği/Bileşenin pik alanı ya da yüksekliği] x [Bileşenin konsantrasyonu ($\mu\text{g/g}$)/İç Standardın konsantrasyonu ($\mu\text{g/g}$)]

Bileşenin konsantrasyonu = C çözeltilisindeki (2.4.14.3) bileşenin konsantrasyonu

İç standardın konsantrasyonu = C çözeltilisindeki (2.4.14.3) iç standardın konsantrasyonu

2.8.1.1. Numune analiz

Aşağıdaki formül kullanılarak numunelerdeki her bir bileşenin konsantrasyonu hesaplanır.

Formül (2);

Bileşenin konsantrasyonu, ($\mu\text{g/g}$) = [Bileşenin pik alanı ya da yüksekliği/İç standardın pik alanı ya da yüksekliği] x [İç standardın kütlesi (M_{IS}) (g) / Numunenin kütlesi (M_{numune}) (g)] x İç standardın konsantrasyonu ($\mu\text{g/g}$) x RF

M_{numune} = numunenin ağırlığı (2.7.1.2)

$M_{\text{iç standart}}$ = İç standardın ağırlığı (2.7.1.3)

İç standardın konsantrasyonu = E çözeltilisindeki (2.4.14.5) iç standardın konsantrasyonu

RF = Formül (1) yardımıyla hesaplanan tepki faktörü

2.8.1.2. Kalite kontrol standart çözeltilisinin analizi

Aşağıdaki formül kullanılarak kalite kontrol standart çözeltilisindeki (2.4.14.7) her bir bileşen için hedef değer % geri alması hesaplanır.

Formül (3);

Kalite kontrol numunesinin % geri alması = (Kalite kontrol standart çözeltilisindeki analitin konsantrasyonu / D çözeltilisindeki analitin konsantrasyonu) x 100

Kalite kontrol standart çözeltilisindeki analit konsantrasyonu yukarıda belirtilen formül (1) ve formül (2) yardımıyla hesaplanır.

2.8.2. Sonuçların açıklanması

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formül (4) yardımıyla $\mu\text{g/g}$ ' dan g/L mutlak Alkole (mA) çevrilir.

Mutlak Alkol = Hacmen %100'lük alkol

Formül (4);

Konsantrasyon (Mutlak alkolün 100 L 'sinde g olarak, g/L mA) = Konsantrasyon ($\mu\text{g/g}$) x ρ x 10 / (Hacmen % alkol miktarı x 1000)

ρ = yoğunluk (kg/m^3)

Sonuçlar, üç basamaklı ve en fazla tek ondalıklı olarak, g/L mA şeklinde verilir. Örneğin, 100 L mutlak alkolde 11,4 g olarak.

2.9. Metot validasyonu için kullanılan kalite güvence ve kontrolü

Formül (2) kullanılarak, 2.7.1.'deki işlemlere göre hazırlanan kalite kontrol standart çözeltililerindeki her bir bileşenin konsantrasyonu hesaplanır. Daha sonra formül (3) kullanılarak hedef değer % geri alması hesaplanır. Eğer analiz sonuçları her bileşen için onların beklenen teorik değerlerinden \pm %10 sapma sınırındaysa sonuçlar kabul edilebilir olarak değerlendirilir. Aksi takdirde, analizdeki yanlışlık tespit edilir ve düzeltilir.

2.10. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları:

Aşağıdaki tablo etanal, etil asetat, asetal, toplam etanal, metil alkol, bütan-2-ol, propan-1-ol, bütan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-bütan-1-ol, 3-metil-bütan-1-ol'un değerlerini verir.

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metot performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 32

Numune sayısı 5

Analit

Etanal

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	28	26	27	27	28
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	2	4	3	3	2
Kabul edilen sonuç sayısı	56	52	54	54	56
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8*	28,6 52,2*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	12	14	22	6,8	8,9
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), $\mu\text{g/g}$	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1
Numune türleri					
A Brendi; kör tekrarlar					
B Kirsch; kör tekrarlar					
C Grappa; kör tekrarlar					
D Viski; split oranı (*)					
E Rom; split oranı (*)					

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 32

Numune sayısı 5

Analit

Etil asetat

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	24	24	25	24	24
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	2	2	1	2	2
Kabul edilen sonuç sayısı	48	48	50	48	48

Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	96,8	1046	120,3	112,5 91,8*	99,1 117,0*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), $\mu\text{g/g}$	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0
Numune türleri					
A Brendi; kör tekrarlar					
B Kirsch; kör tekrarlar					
C Grappa; kör tekrarlar					
D Viski; split oranı (*)					
E Rom; split oranı (*)					

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 32

Numune sayısı 5

Analit Asetal

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	20	21	22	17	21
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	4	3	2	4	3
Kabul edilen sonuç sayısı	40	42	44	34	42
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60*	15,1 28,3*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3

Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), $\mu\text{g/g}$	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7
Numune türleri					
A Brendi; kör tekrarlar					
B Kirsch; kör tekrarlar					
C Grappa; kör tekrarlar					
D Viski; split oranı (*)					
E Rom; split oranı (*)					

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 32

Numune sayısı 5

Analit Toplam etanal

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	23	19	22	21	22
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	1	5	2	3	2
Kabul edilen sonuç sayısı	46	38	44	42	44
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8*	32,7 61,8*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	13	15	24,1	7,3	9,0
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), $\mu\text{g/g}$	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2
Numune türleri					

A Brendi; kör tekrarlar

B Kirsch; kör tekrarlar

C Grappa; kör tekrarlar

D Viski; split oranı (*)

E Rom; split oranı (*)

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997
Laboratuvar sayısı 32
Numune sayısı 5
Analit Metil alkol

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	26	27	27	28	25
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	4	3	3	1	4
Kabul edilen sonuç sayısı	52	54	54	56	50
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	319,8	2245	1326	83,0 61,5*	18,6 28,9*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	4,4	27	22	1,5	1,3
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	13	99	60	4,5	2,8
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), $\mu\text{g/g}$	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9
Numune türleri					
A Brendi; kör tekrarlar					
B Kirsch; kör tekrarlar					
C Grappa; kör tekrarlar					
D Viski; split oranı (*)					
E Rom; split oranı (*)					

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997
Laboratuvar sayısı 32
Numune sayısı 4
Analit Bütan-2-ol

Numuneler	A	B	C	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	21	27	29	22

Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	4	3	1	3
Kabul edilen sonuç sayısı	42	54	58	44
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	0,40	2,2	0,87	0,64
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	1,1	6,1	2,5	1,8
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	0,89	13	3,2	0,87
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), $\mu\text{g/g}$	2,5	35,5	8,9	2,4
Numune türleri				
A Brendi; kör tekrarlar				
B Kirsch; kör tekrarlar				
C Grappa; kör tekrarlar				
E Rom; split oranı (*)				

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 32

Numune sayısı 5

Analit Propan-1-ol

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	29	27	27	29	29
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	2	4	3	2	2
Kabul edilen sonuç sayısı	58	54	54	58	58
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	86,4	3541	159,1	272,1 229,3*	177,1 222,1*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6

(RSD _r) (%)					
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S _R), µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD _R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7
Numune türleri					
A Brendi; kör tekrarlar					
B Kirsch; kör tekrarlar					
C Grappa; kör tekrarlar					
D Viski; split oranı (*)					
E Rom; split oranı (*)					

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997
Laboratuvar sayısı 32
Numune sayısı 3
Analit Propan-1-ol

Numuneler	A	B	C
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	20	22	22
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	4	4	6
Kabul edilen sonuç sayısı	40	44	44
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	3,79	5,57	7,54
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	0,43	0,20	0,43
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	1,1	0,6	1,2
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	0,59	0,55	0,82
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), $\mu\text{g/g}$	1,7	1,5	2,3
Numune türleri A Brendi; kör tekrarlar B Kirsch; kör tekrarlar C Grappa; kör tekrarlar (*)			

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997
Laboratuvar sayısı 32
Numune sayısı 5
Analit 2-metilpropan-1-ol

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	28	31	30	26	25
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	3	0	1	5	6
Kabul edilen sonuç sayısı	56	62	60	52	50
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	174,2	111,7	185,0	291,0 246,8*	115,99 133,87*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r),	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74

$\mu\text{g/g}$					
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), $\mu\text{g/g}$	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4
Numune türleri					
A Brendi; kör tekrarlar					
B Kirsch; kör tekrarlar					
C Grappa; kör tekrarlar					
D Viski; split oranı (*)					
E Rom; split oranı (*)					

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 32

Numune sayısı 5

Analit til-bütan-1-ol

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	25	26	25	27	25
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	3	2	3	1	2
Kabul edilen sonuç sayısı	50	52	50	54	50
Ortalama değer (\bar{x}), $\mu\text{g/g}$	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2*	39,5 61,5*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r), $\mu\text{g/g}$	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), $\mu\text{g/g}$	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), $\mu\text{g/g}$	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8

sapma (RSD _R) (%)					
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5
Numune türleri					
A Brendi; kör tekrarlar					
B Kirsch; kör tekrarlar					
C Grappa; kör tekrarlar					
D Viski; split oranı (*)					
E Rom; split oranı (*)					

Laboratuvarlararası analiz yılı 1997

Laboratuvar sayısı 32

Numune sayısı 5

Analit 3-metil-bütan-1-ol

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	23	23	24	27	21
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	5	5	4	1	6
Kabul edilen sonuç sayısı	46	46	48	54	42
Ortalama değer (\bar{x}), µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4*	212,3 245,6*
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S _r), µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD _r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S _R), µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD _R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9

Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7
Numune türleri					
A Brendi; kör tekrarlar					
B Kirsch; kör tekrarlar					
C Grappa; kör tekrarlar					
D Viski; split oranı (*)					
E Rom; split oranı (*)					

Ek-4

DİSTİLE ALKOLLÜ İÇKİLERDE TRANS-ANETOL'ÜN GAZ KROMATOĞRAFİSİ İLE BELİRLENMESİ

1. Kapsam

Bu metot kapiler GC kullanılarak anason aromalı distile alkollü içkilerdeki trans-anetolün belirlenmesi için kullanılır.

2. Prensiy

Yüksek alkollü içkilerdeki trans-anetol konsantrasyonu, GC yardımıyla belirlenir. Eşit miktarda bir iç standart [örneğin, numunede doğal olarak estragol bulunmuyorsa 4-allilanol (estragol)], analiz edilecek numuneye ve konsantrasyonu bilinen referans trans-anetol çözeltisine eklenerek % 45'lik etil alkol çözeltisiyle seyreltikten sonra GC sistemine doğrudan enjekte edilir. Yüksek miktarlarda şeker içeren likör numunelerinin hazırlanması ve analizinden önce doğrudan ekstraksiyon gereklidir.

3. Reaktifler ve materyaller

Analiz esnasında yalnızca en az %98 saflıkta reaktifler ve en az TS EN ISO 3696'da tanımlanan sınıf 3 su kullanılır.

Referans kimyasallar soğukta (4 °C), ışıktan uzakta, alüminyum kaplarda veya amber renkli cam reaktif şişelerinde saklanmalıdır. Alüminyum sızdırmaz conta yerleştirilmiş kapaklar tercih edilmelidir. Kullanmadan önce trans-anetolün kristal halinden ısıtılarak eritilmesi gerekir, fakat bu durumda sıcaklık kesinlikle 35 °C' yi geçmemelidir.

3.1. Hacmen %96'lık etil alkol (CAS 64-17-5)

3.2. 1-metoksi-4-(1-propenil)-benzen; (trans-anetol) (CAS 4180-23-8)

3.3. 4-allilanol (estragol); iç standart olarak kullanılır. (CAS 140-67-0)

3.4. Hacmen %45'lik etil alkol

Hacmen %96'lık etil alkolün 378 g'ına 560 g distile su eklenir.

3.5. Standart çözeltilerin hazırlanması

Tüm standart çözeltiler oda sıcaklığında (15-35 °C), ışıktan uzakta, alüminyum kaplarda veya amber renkli cam reaktif şişelerinde saklanmalıdır. Alüminyum sızdırmaz conta yerleştirilmiş kapaklar kullanılmalıdır.

Trans-anetol ve 4-allilanol pratikte suda çözünmez ve bu nedenle hacmen %45'lik etil alkol (3.4) eklemeyden önce; bir miktar hacmen %96'lık etil alkol (3.1) içerisinde çözülmesi gerekir.

Stok çözeltiler her hafta yeniden hazırlanmalıdır.

3.5.1. Standart çözelti A

Trans-anetolün stok çözeltisi (konsantrasyon 2 g/L)

20 mL hacimli balon jöjeye 40 mg trans-anetol (3.2) aktarılır (ya da 200 mL hacimli balon jöjeye 400 mg), bir miktar hacmen %96'lık etil alkol (3.1) ilave edilir ve hacmen %45'lik etil alkol (3.4) ile 20 mL'ye tamamlanarak iyice karıştırılır.

3.5.2. İç standart çözeltisi B

İç standart stok çözeltisi, örneğin estragol (konsantrasyon 2 g/L)

20 mL hacimli balon jöjeye 40 mg estragol (3.3) aktarılır (ya da 200 mL hacimli balon jöjeye 400 mg), bir miktar hacmen %96'lık etil alkol (3.1) ilave edilir ve hacmen %45'lik etil alkol (3.4) ile 20 mL'ye tamamlanarak iyice karıştırılır.

3.5.3. FID doğrusalılık tepkisini kontrol etmek için kullanılan çözeltiler

FID doğrusalılık tepkisi, yüksek alkollü içkilerde bulunan trans-anetolün 0 ile 2,5 g/L aralığındaki konsantrasyonları dikkate alınarak kontrol edilir.

Analiz işleminde, analiz edilecek olan yüksek alkollü içkilerin bilinmeyen numuneleri 10 kat seyreltilir (7.3). Metotta tanımlanan analiz koşulları için, analiz edilecek numunedeki trans-anetolün 0 - 0,05 - 0,1 - 0,15 - 0,2 ve 0,25 g/L konsantrasyonlarına eş değer stok çözeltileri şu şekilde hazırlanır:

Stok çözelti A'dan (3.5.1) 0,5 - 1 - 1,5 - 2 ve 2,5 mL alınır ve 20 mL'lik balon jöjeler içerisine aktarılır. Sonra her bir balon jöjeye 2 mL iç standart çözelti B'den (3.5.2) eklenir ve hacmen %45'lik etil alkol (3.4) ile 20 mL'ye tamamlanarak iyice karıştırılır.

Kör çözeltisi (7.4), 0 g/L çözelti olarak kullanılır.

3.5.4. Standart çözelti C

Standart çözelti A'dan (3.5.1) 2 mL alınır ve 20 mL'lik balon jöjeye aktarılır, sonra 2 mL iç standart çözeltisi B'den (3.5.2) eklenir ve hacmen %45'lik etil alkol (3.4) ile 20 mL'ye tamamlanır, iyice karıştırılır.

4. Araç ve gereçler

4.1. FID'a bağlı kapiler GC, piklerin alanını ve yüksekliğini ölçebilen bilgisayar programı ya da veri işleme sistemi ve bir otomatik örnekleyici veya manuel numune enjeksiyonu için gerekli aletler.

4.2. Split/splitless enjektörü

4.3. Kapiler kolon, örneğin:

Uzunluk 50 m, iç çap: 0,32 mm, film kalınlığı: 0,2 µm, sabit faz: FFAP-poröz polimere çapraz bağlı modifiye TPA polietilen glikol.

4.4. Genel laboratuvar gereçleri: A sınıfı ölçülü cam kap/A sınıfı dereceli ölçü silindiri, analitik terazi ($\pm 0,1$ mg hassasiyette)

5. Kromatografi koşulları

Kolon tipi ve boyutları ve GC koşulları, anetol ve iç standardın birbirlerinden ve diğer karışan maddelerden en iyi şekilde ayrılmasına olanak sağlayacak özellikte olmalıdır. Madde 4.3'te örnek olarak verilen kolon için tipik koşullar aşağıda verilmiştir:

5.1. Taşıyıcı gaz: Analitik helyum

5.2. Akış hızı: 2 mL/dk

5.3. Enjeksiyon sıcaklığı: 250 °C

5.4. Dedektör sıcaklığı: 250 °C

5.5. Fırın sıcaklık koşulları: izotermal, 10 dakikada 180 °C'ye erişebilen

5.6. Enjeksiyon hacmi: 1 µL, split oranı 1:40

6. Numuneler

Numuneler oda sıcaklığında, cam kaplarda, güneş ışığından uzakta (mümkünse karanlıkta soğukta) saklanmalıdır.

7. İşlem

7.1. Estragol için numune taraması

Numunede doğal olarak estragol bulunmadığından emin olmak için, iç standart eklenmeden bir kör analiz gerçekleştirilir. Eğer doğal olarak estragol bulunuyorsa o zaman farklı bir iç standart seçilmelidir (örneğin mentol).

20 mL'lik balon jöjeye 2 mL numune pipetle aktarılır ve hacmen %45'lik etil alkol (3.4) ile 20 mL'ye tamamlanır ve iyice karıştırılır.

7.2. Bilinmeyen numunelerin hazırlanması

20 mL'lik balon jöjeye 2 mL numune pipetle aktarılır. Sonra iç standart çözeltisi B (3.5.2)'den 2 mL ilave edilir ve hacmen %45'lik etil alkol (3.4) ile 20 mL'ye tamamlanarak iyice karıştırılır.

7.3. Kör

20 mL'lik balon jöjeye iç standart çözeltisi B (3.5.2)'den 2 mL pipetle aktarılır ve hacmen %45'lik etil alkol (3.4) ile 20 mL'ye tamamlanır ve iyice karıştırılır.

7.4. Doğrusallık testi

Analize başlamadan önce FID tepki doğrusallığı, doğrusallık standart çözeltilerinin (3.5.3) her birinin üç kez başarıyla analiz edilmesiyle kontrol edilmelidir.

Her enjeksiyon için, bilgisayar programının pik alanları ve yüksekliklerinden; her biri için R oranına karşılık, onların ana çözeltilerinin g/L olarak konsantrasyonunun grafiği çizilir.

R = Estragol pik yüksekliği veya alanı ile bölünen trans-anetol pik yüksekliği veya alanı.

Doğrusal bir eğri elde edilmelidir.

7.5. Belirleme

Kör çözelti (7.3) enjekte edilir. Sonra standart çözelti C (3.5.4) enjekte edilir ve bunu kalite kontrol numunesi olarak (Bu numune bilinmeyen numunedeki trans-anetolün muhtemel konsantrasyonunun referansı ile seçilebilir.) hareket eden doğrusallık standart çözeltilerinin birisi (3.5.3) ve 5 tane bilinmeyen numune (7.2) takip eder. Her bilinmeyen numuneden sonra analitik kararlılığı saptamak için bir doğrusallık (kalite kontrol) numunesi enjekte edilir.

8. Tepki faktörünün hesaplanması

Trans-anetol ve iç standart pikleri için; pik alanları (bilgisayar sistemi ya da başka bir veri sistemi kullanarak) ya da pik yükseklikleri (manuel integrasyon) ölçülür.

8.1. Tepki faktörü (RF_i) hesaplama

Tepki faktörü şu şekilde hesaplanır:

$$RF_i = (C_i / \text{alan}_i \text{ ya da yükseklik}_i) \times (\text{alan}_{is} \text{ ya da yükseklik}_{is} / C_{is})$$

Burada,

C_i: Standart çözelti A (3.5.1) içerisindeki trans-anetolün konsantrasyonu

C_{is}: İç standart çözeltisi B (3.5.2) içerisindeki iç standardın konsantrasyonu

Alan_i: Trans-anetol pikinin alanı (ya da yüksekliği)

Alan_{is}: İç standart pikinin alanı (ya da yüksekliği)'ni ifade eder.

RF_i, standart çözelti C'nin (3.5.4) 5 numunesinden hesaplanır.

8.2. Test çözeltilerinin doğrusallık tepkisinin analizi

Doğrusallık tepki test çözeltileri (3.5.3) enjekte edilir.

8.3. Numunenin analizi

Bilinmeyen numune çözeltisi enjekte edilir.

9. Sonuçların hesaplanması

Trans-anetol konsantrasyonunun hesaplaması için kullanılan formül şu şekildedir:

$$C_i = C_{is} \times (\text{alan}_i \text{ ya da yükseklik}_i / \text{alan}_{is} \text{ ya da yükseklik}_{is}) \times RF_i$$

C_i: Bilinmeyen trans-anetol konsantrasyonu

C_{is}: Bilinmeyen çözelti (3.5.2) içerisindeki iç standardın konsantrasyonu

Alan_i ya da yükseklik_i: Trans-anetol pikinin alanı ya da yüksekliği

Alan_{is} ya da yükseklik_{is}: İç standart pikinin alanı ya da yüksekliği

RF_i: Tepki faktörü (8.1'deki gibi hesaplanır)

Trans-anetol konsantrasyonu, g/L şeklinde tek ondalıklı olarak verilir.

10. Kalite güvence ve kontrolü

Kromatogramlar anetol ve iç standardın birbirlerinden ve diğer karışan maddelerden en iyi şekilde ayrılmasına olanak sağlayacak nitelikte olmalıdır.

RF_i değeri, çözelti C'nin (3.5.4) 5 enjeksiyon tekrarından hesaplanır. Eğer varyasyon katsayısı [%CV = (standart sapma/ortalama)x100] ± %1 ise, RF_i ortalama değeri kabul edilebilir.

Yukarıdaki hesaplama, doğrusallık kontrol çözeltilerinden (3.5.3) kalite kontrol için seçilmiş numunedeki trans-anetol konsantrasyonunun hesaplanması için kullanılır.

İç kalite kontrol numunesi için seçilmiş doğrusallık çözeltilerinin analiz sonuçlarından hesaplanan ortalama; teorik değerlerinin ± %2,5'u ise, bilinmeyen numunelerin sonuçları kabul edilebilir olarak değerlendirilir.

11. GC analizinden önce likör numunelerinin ve yüksek miktarlarda şeker içeren yüksek alkollü içki numunesinin analize hazırlanması

Kapiler GC kullanılarak, trans-anetol konsantrasyonunun belirlenebilmesi için, yüksek miktarda şeker içeren alkollü içkilerden alkolün ekstraksiyonu:

11.1. Prensip

Bir miktar likör numunesi alınır ve likördeki analitin (trans-anetol) konsantrasyonuna benzer konsantrasyonda iç standart eklenir. Buna, sodyum fosfat dodekahidrat ve susuz amonyum sülfat eklenir. Oluşan karışım iyice çalkalanır ve soğutulur. İki tabaka oluşur, üstteki alkol tabakası uzaklaştırılır. Bu alkol tabakasından bir kısım alınır ve % 45'lik etil alkol çözeltisi (3.4) ile seyreltilir (Bu aşamada iç standart eklenmez çünkü daha önce zaten eklenmiştir.). Elde edilen çözelti GC'de analiz edilir.

11.2. Reaktifler ve materyaller

Alkolün ekstraksiyonu sırasında yalnızca %99'dan daha yüksek saflıkta reaktifler kullanılır.

11.2.1. Susuz amonyum sülfat, (CAS 7783-20-2)

11.2.2. Dibazik sodyum fosfat, dodekahidrat (CAS 10039-32-4)

11.3. Araç ve gereçler

Erlenler, ayırma hunileri, buzdolabı.

11.4. İşlem

11.4.1. Estragol için numune taraması

Numunede doğal olarak estragol bulunmadığından emin olmak için herhangi bir iç standart eklenmeden kör ekstraksiyon ve analiz gerçekleştirilir. Eğer doğal olarak estragol bulunuyorsa o zaman farklı bir iç standart seçilmelidir.

11.4.2. Ekstraksiyon

5 mL hacmen %96'lık etil alkol (3.1) erlene aktarılarak erlen içerisine 50 mg iç standart (3.3) tartılır ve 50 mL numune eklenir. 12 g susuz amonyum sülfat (11.2.1) ve 8,6 g dibazik sodyum fosfat, dodekahidrat (11.2.2) eklenerek erlen kapatılır.

Erlen en az 30 dakika çalkalanır. Mekanik karıştırıcı kullanılabilir ancak teflon kaplamalı manyetik karıştırıcı kullanılmaz. Çünkü teflon analitin bir kısmını absorbe edebilir. Eklenen tuzların bütünüyle çözünmesi beklenmez.

Kapalı erlen buzdolabında 5 °C'den düşük sıcaklıkta en az 2 saat bekletilmelidir.

Bu süre sonunda iki ayrı sıvı faz ve katı çöküntü oluşur. Alkol tabakası berrak olmalıdır. Değilse berrak tabaka oluşuncaya kadar buzdolabında bekletilmelidir.

Alkol tabakası berrak olduğunda, sıvı fazını bozmadan dikkatlice bir miktar (örneğin 10 mL) alınır, amber renkli tartı kabına konular ve sıkı bir şekilde kapatılır.

11.4.3. Ekstrakte edilen numunenin analize hazırlanması

Ekstraktın (11.4.2) oda sıcaklığına erişmesi sağlanır.

Ekstrakte edilmiş numunenin alkol fazından 2 mL alınarak 20 mL'lik balon jöjeye konular. %45'lik etil alkol ile (3.4) 20 mL'ye tamamlanır ve iyice karıştırılır.

11.5. Belirleme

Madde 7.5'teki işlem takip edilir.

11.6. Sonuçların hesaplanması

Sonuçların hesaplanması için şu formül kullanılır:

$$C_i = (m_{is}/V) \times (alan_i/alan_{is}) \times RF_i$$

Burada;

m_{is} : İç standardın ağırlığı (mg) (11.4.2'de tartılan ağırlık)

V: Bilinmeyen numunenin hacmi (50 mL)

RF_i : Tepki faktörü (8.1)

$alan_i$: Trans-anetol pikinin alanı

$alan_{is}$: İç standart pikinin alanı'nı ifade eder.

Sonuçlar, g/L şeklinde tek ondalıklı olarak verilir.

11.7. Kalite kontrol ve güvence

Madde 10'daki işlem takip edilir.

12. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları:

Aşağıdaki tablolar anetol için değerleri verir.

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metot performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1998

Laboratuvar sayısı 16

Numune sayısı 10

Analit Anetol

Pastis:

Numuneler	A	B	C	D	E	F
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	15	15	15	13	16	16
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	1	1	1	3	–	–
Kabul edilen sonuç sayısı	30	30	30	26	16	16
Ortalama değer, g/L	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r) g/L,	0,022	0,033	0,034	0,017	–	–
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	–	–
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), g/L	0,062	0,093	0,096	0,047	–	–
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), g/L	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), g/L	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119
Numune türleri						
A pastis, kör tekrarlar						
B pastis, kör tekrarlar						
C pastis, kör tekrarlar						
D pastis, kör tekrarlar						
E pastis, tek tekrar						
F pastis, tek tekrar						

Diğer anason aromalı distile alkollü içkiler:

Numuneler	G	H	I	J
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	16	14	14	14
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	–	2	1	1
Kabul edilen sonuç sayısı	32	28	28	28
Ortalama değer, g/L	0,778 0,530(*)	1,742	0,351	0,599
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r) g/L,	0,020	0,012	0,013	0,014
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), g/L	0,056	0,033	0,038	0,038
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), g/L	0,031	0,029	0,021	0,030
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), g/L	0,088	0,080	0,058	0,084
Numune türleri				
G ouzo, split oranı (*)				
H anis, kör tekrarlar				
I anason aromalı likör, tekrarlar				
J anason aromalı likör, tekrarlar				

Ek-5

YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ KULLANILARAK GLİSİRİZİK ASİTİN BELİRLENMESİ

1. Kapsam

Bu metot, anason aromalı distile alkollü içkilerde glisirhizik asitin HPLC kullanılarak belirlenmesi için kullanılır. Distile Alkollü İçkiler Tebliği'nde "pastis" olarak adlandırılan anason aromalı distile alkollü içkilerde glisirhizik asit miktarının 0,05 g/L'den az, 0,5 g/L'den çok olmaması gerektiği belirtilmektedir.

2. PrensiP

Glisirhizik asit konsantrasyonu, UV detektörlü HPLC kullanılarak belirlenir. Standart çözelti ve test numunesi filtre edildikten sonra HPLC'ye ayrı ayrı doğrudan enjekte edilir.

3. Reaktifler ve materyaller

Analiz sırasında sadece HPLC saflığında reaktifler ve TS EN ISO 3696'da tanımlanan sınıf 3 su kullanılır.

3.1. Hacmen %96'lık etil alkol, (CAS 64-17-5)

3.2. Amonyum glisirhizinat, C₄₂H₆₂O₁₆.NH₃ (Glisirhizik asit amonyum tuzu)

(Molekül ağırlığı: 839,98)(CAS 53956-04-0): en az %90 saflıkta

(Molekül ağırlığı: glisirhizik asit 822,94)

3.3. Buzlu asetik asit, CH₃COOH, (CAS 64-19-7)

3.4. Metil alkol, CH₃OH (CAS 67-56-1)

3.5. Hacmen %50'lik etil alkol,

20 °C'de 1000 mL için:

- Hacmen %96'lık etil alkol (3.1): 521 mL

- Su: 511 mL

3.6. HPLC elüsyon çözeltilerinin hazırlanması

3.6.1. Elüsyon çözücü A (örnek)

Hacimce 80 birim su, 20 birim asetik asit (3.3).

Elüsyon çözücünün 5 dakika süresince gazı alınır.

Not: Eğer kullanılan su mikrofiltre edilmemiş ise hazırlanan elüsyon çözücünün filtrasyonunda, gözenek büyüklüğü en fazla 0,45 µm olan, organik çözücüler için kullanılan filtreler tavsiye edilir.

3.6.2. Elüsyon çözücü B

Metil alkol (3.4)

3.7. Standart çözeltilerin hazırlanması

Tüm standart çözeltiler her 2 ayda bir yeniden hazırlanmalıdır.

3.7.1. Referans çözelti C

100 mL'lik balon jøjeye 0,1 mg hassasiyetle 25 mg amonyum glisirhizinat (3.2) tartılır. Bir miktar %50'lik etil alkol (3.5) eklenir ve amonyum glisirhizinat çözündürülür. Çözünmesinin ardından %50'lik etil alkol ile (3.5) hacmi tamamlanır ve organik çözücüler için kullanılan filtre ile filtre edilir.

3.7.2. Cihazın doğrusallık tepkisini kontrol etmek için kullanılan standart çözeltiler

1,0 g/L stok çözelti hazırlamak için 100 mL'lik balon jøjeye 0,1 mg hassasiyetle 100 mg amonyum glisirhizinat tartılır. Bir miktar %50'lik etil alkol (3.5) eklenir ve amonyum glisirhizinat çözündürülür. Çözünmesinin ardından %50'lik etil alkol ile (3.5) hacmi tamamlanır.

0,05 - 0,1 - 0,25 ve 0,5 g/L amonyum glisirhizinata karşılık gelen en az dört başka çözelti, 100 mL'lik balon jøjelere ayrı ayrı 1,0 g/L stok çözeltilerden sırasıyla 5 mL, 10 mL, 25 mL ve 50 mL aktararak hazırlanır. Hacimleri %50'lik etil alkol ile (3.5) tamamlanır ve iyice karıştırılır. Tüm çözeltiler organik çözücüler için kullanılan filtre ile filtre edilir.

4. Araç ve gereçler

4.1. Ayırma sistemi

4.1.1. HPLC

4.1.2. Bir kez ayarlandığı akış hızında sabit kalabilen ya da yüksek duyarlılıkta akış hızına programlanabilen pompalama sistemi

4.1.3. 254 nm'ye ayarlı UV spektrofotometrik tespit/saptama sistemi

4.1.4. Çözücüdeki gazı giderici sistem

4.2. Sayısal bilgisayar programı ya da kaydedici, sistemin geri kalanı ile uyumlu bir performansa sahip.

4.3. Kolon (örnek);

Paslanmaz çelik ya da cam materyalden yapılmış, iç çapı 4-5 mm, uzunluğu 100-250 mm, sabit fazı partikül boyutu en fazla 5 µm, (tercihen küresel) oktadesil fonksiyonel grup (C18) ile çapraz bağlı silika olan.

4.4. Laboratuvar gereçleri

4.4.1. 0,1 mg hassasiyetinde analitik terazi,

4.4.2. A sınıfı ölçülü cam kap/A sınıfı dereceli ölçü silindiri

4.4.3. Küçük hacimler için mikromembran filtrasyon düzeneği

5. Kromatografi koşulları

5.1. Elüsyon karakteristikleri (örnek)

- Akış hızı: 1 mL/dk

- Çözücü A = %30

- Çözücü B = %70

5.2. Tespit/Saptama

- UV = 254 nm

6. İşlem

6.1. Yüksek alkollü içki numunesinin hazırlanması

Eğer gerekli ise gözenek büyüklüğü en fazla 0,45 µm olan ve organik çözücüler için kullanılan filtre ile filtre edilir.

6.2. Belirleme

Öncelikle kromatografi koşulları sabitlenir.

- 20 µL referans çözeltisi C (3.7.1) enjekte edilir,

- 20 µL numune çözeltisi enjekte edilir,

- İki kromatogram karşılaştırılır. Alınma sürelerinden glisirhizik asidin pikleri tanımlanır. Alanları ya da yükseklikleri ölçülür ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak iki ondalıklı olarak g/L şeklinde konsantrasyon hesaplanır:

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

Burada;

c: Analiz edilen numunedeki glisirhizik asidin konsantrasyonu (g/L),

C: Referans çözeltildeki amonyum glisirhizinatın konsantrasyonu (g/L),

h: Analiz edilen numunedeki glisirhizik asit pikinin alanı ya da yüksekliğini,

H: Referans çözeltildeki glisirhizik asit pikinin alanı ya da yüksekliğini,

P: Referans amonyum glisirhizinatın % olarak saflığını,

823: Bir mol glisirhizik asitin kütesini,

840: Bir mol amonyum glisirhizinatın kütesini ifade eder.

7. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları:

Aşağıdaki tablo glisirhizik asit için değerleri verir.

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metot performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1998

Laboratuvar sayısı 16

Numune sayısı 5

Analit Glisirhizik asit

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	13	14	15	16	16
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	3	2	1	–	–
Kabul edilen sonuç sayısı	26	28	30	32	32
Ortalama değer, g/L	0,046	0,092 (*)0,099	0,089	0,249	0,493
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_r) g/L,	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), g/L	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S_R), g/L	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), g/L	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Numune türleri

A pastis, kör tekrarlar

B pastis, split oranı (*)

C pastis, kör tekrarlar

D pastis, kör tekrarlar

E pastis, kör tekrarlar

Ek-6

PASTİSTE KALKONLARIN VARLIĞINI KANITLAMAK İÇİN YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİ METODU

1. Kapsam

Bu metot, anason aromalı içkilerde kalkonların bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla kullanılır. Kalkonlar, meyan kökünde (*Glycyrrhiza glabra*) bulunan flavonoid ailesinin doğal renklendiricileridir.

Anason aromalı bir distile içkinin “pastic” olarak adlandırılabilmesi için, kalkonlar içermesi gerekir.

2. Prensiy

Referans meyan kökü ekstrakt çözeltisi hazırlanır. Kalkonların bulunup bulunmadığı; UV detektörlü HPLC kullanılarak belirlenir.

3. Reaktifler ve materyaller

Analiz sırasında, yalnızca HPLC saflığında reaktifler ve TS EN ISO 3696’da tanımlanan sınıf 3 su kullanılır. Etil alkol hacmen %96’lık olmalıdır.

3.1. Hacmen %96’lık etil alkol (CAS 64-17-5)

3.2. Asetonitril, CH₃CN, (CAS 75-05-8)

3.3. Referans madde: Meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*)

Kabaca öğütülmüş meyan kökü. Çubuk şeklindeki taneciklerin/parçacıkların ortalama boyutları; 10-15 mm uzunluğunda, 1-3 mm kalınlığında.

3.4. Sodyum asetat, CH₃COONa, (CAS 127-09-3)

3.5. Buzlu asetik asit, CH₃COOH, (CAS 64-19-7)

3.6. Çözeltilerin hazırlanması

3.6.1. Hacmen %50’lik etil alkol

20 °C’de 1000 mL için:

- Hacmen %96’lık etil alkol (3.1): 521 mL

- Su: 511 mL

3.6.2. Çözücü A: asetonitril

HPLC analitik saflığında, gazı alınmış asetonitril (3.2.)

3.6.3. Çözücü B: 0,1 M sodyum asetat tampon çözeltisi, pH 4,66.

8,203 g sodyum asetat (3.4) tartılır, 6,005 g buzlu asetik asit (3.5) eklenir ve balon jodede su ile 1000 mL’ye tamamlanır.

4. *Glycyrrhiza glabra*’dan (3.3) referans ekstraktın hazırlanması

4.1. 10 g öğütülmüş meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) (3.3) tartılır ve tabanı yuvarlak distilasyon balonuna aktarılır.

- Hacmen %50’lik etil alkolden (3.6.1) 100 mL eklenir.

- 1 saat süresince geri akışta kaynatılır.

- Filtre edilir.

- Sonraki kullanım için filtrat bir tarafa alınır.

4.2. Filtreden meyan kökü ekstraktının geri eldesi

- Yuvarlak tabanlı distilasyon balonuna yerleştirilir.

- Hacmen %50’lik etil alkolden (3.6.1) 100 mL eklenir.

- 1 saat süresince geri akışta kaynatılır.

- Filtre edilir, sonraki kullanım için filtrat bir tarafa alınır.

- 4.3. Meyan kökü ekstraksiyonu ardışık olarak 3 kez yapılır.
- 4.4. Üç filtrat birleştirilir.
- 4.5. Çözücü faz, döner buharlaştırıcıda uçurulur.
- 4.6. Çöküntü ekstrakt, 100 mL hacmen %50'lik etil alkol (3.6.1) ile alınır.

5. Araç ve gereçler

5.1. Ayırma sistemi

5.1.1. HPLC

5.1.2. Bir kez ayarlandığı akış hızında sabit kalabilen ya da yüksek duyarlılıkta akış hızına programlanabilen pompalama sistemi

5.1.3. UV/görünür spektrofotometrik tespit/saptama sistemi, 254 nm ve 370 nm'ye ayarlanabilen

5.1.4. Çözücüdeki gazı giderici sistem

5.1.5. $40 \pm 0,1$ °C sıcaklığa ayarlanabilen kolon fırını.

5.2. Sayısal bilgisayar programı ya da kaydedici, sistemin geri kalanı ile uyumlu bir performansa sahip.

5.3. Kolon

Paslanmaz çelik ya da cam materyalden yapılmış, iç çapı 4-5 mm, sabit fazı partikül boyutu en fazla 5 µm, oktadesil fonksiyonel grup (C18) ile çapraz bağlı silika olan.

5.4. Genel laboratuvar gereçleri

5.4.1. $\pm 0,1$ mg hassasiyetinde analitik terazi

5.4.2. Geri soğutuculu distilasyon düzeneği, örneğin aşağıdakileri içeren;

- Küresel şilifli 250 mL'lik yuvarlak tabanlı balon

- 30 cm uzunluğunda geri soğutucu ve

- Termostatlı ısı kaynağı (Uygun bir düzenek ile alkollü içki içerisindeki ekstrakte edilebilen maddenin herhangi bir pirojenik reaksiyonu önlenmelidir.)

5.4.3. Döner buharlaştırıcı (Rotary evaporatör)

5.4.4. Filtrasyon düzeneği (Buchner hunisi gibi)

5.5. Kromatografi koşulları (örnek)

5.5.1. Çözelti A (3.6.2) ve Çözelti B (3.6.3)'nin elüsyon karakteristikleri:

- 15 dakika içerisinde 20/80 (hacim/hacim)'den 50/50 (hacim/hacim) değerine ulaştırılan

- 5 dakika içerisinde 50/50 (hacim/hacim)'den 75/25 (hacim/hacim) değerine ulaştırılan

- 5 dakika için 75/25 (hacim/hacim)'de sabit

- Enjeksiyonlar arasında stabil kalabilen kolon

- 5 dakika için 20/80 (hacim/hacim)'de sabit

5.5.2. Akış hızı: 1 mL/dk

5.5.3. UV detektör ayarları:

Detektör, kalkonların varlığının tespiti için 370 nm'ye ve daha sonra glisirhizik asidin tespiti için 254 nm'ye ayarlanmalıdır.

Not: Dalga boyunun değişimi (370 nm'den 254 nm'ye), glisirhizik asidin elüsyon pikinin başlangıcından 30 saniye önce gerçekleştirilmelidir.

6. İşlem

6.1. Yüksek alkollü içki numunesinin hazırlanması

Gözenek büyüklüğü en fazla 0,45 µm olan ve organik çözücüler için kullanılan filtre ile filtre edilir.

6.2. Çöküntü meyan kökü ekstraktının (4.6) hazırlanması

Analiz öncesinde hacmen %50'lik etil alkol (3.6.1) ile 1:10 oranında seyreltilir.

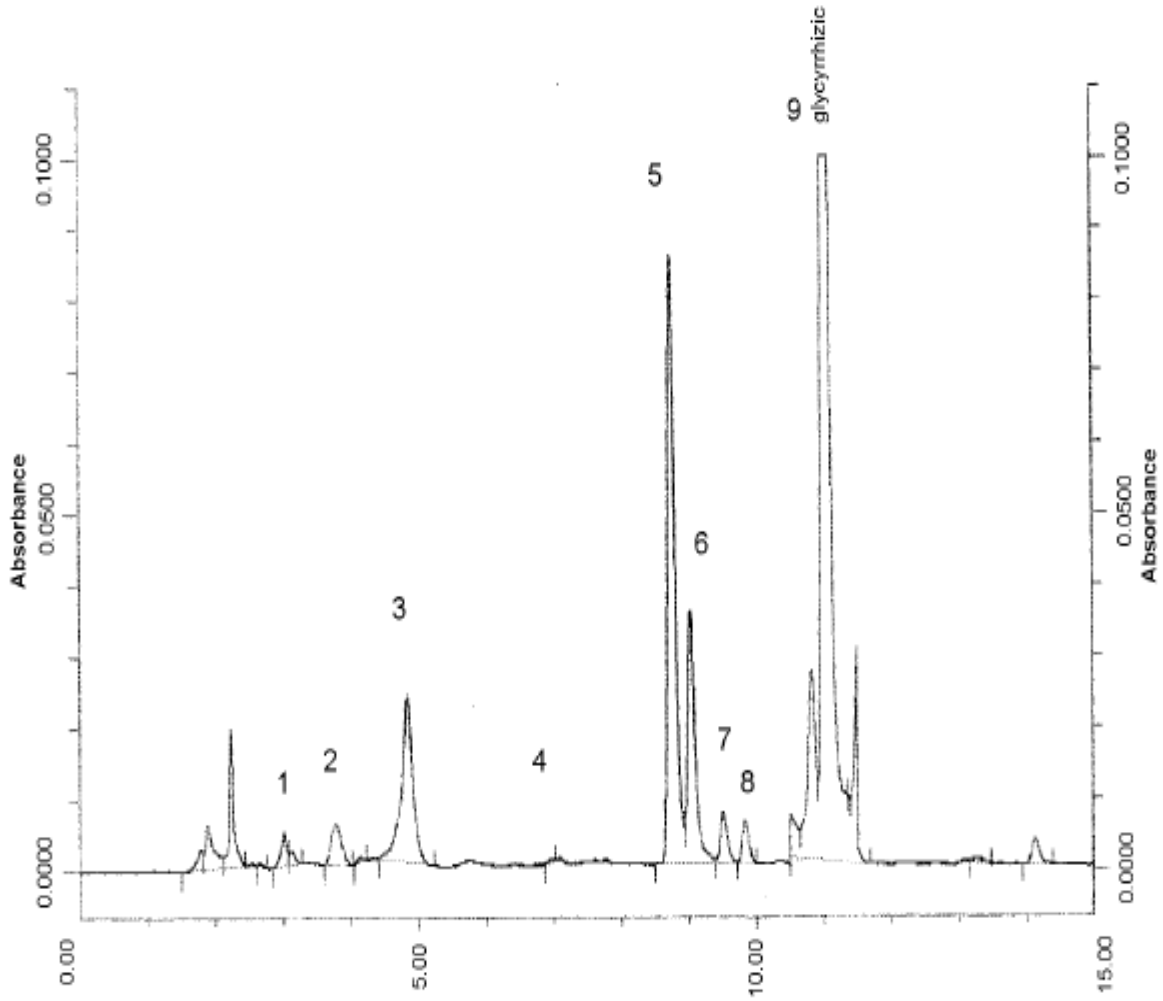
6.3. Belirleme

6.3.1. Hazırlanan meyan kökü ekstraktından (6.2) 20 µL enjekte edilir. Madde 5.5'te tanımlanan kromatografi koşullarında analiz gerçekleştirilir.

6.3.2. 20 µL numune (6.1) (anason aromalı yüksek alkollü içki) enjekte edilir. Madde 5.5.'te tanımlanan kromatografi koşullarında analiz gerçekleştirilir.

6.3.3. İki kromatogram karşılaştırılır. Kalkonun çıkış bölgesinde iki kromatogram arasında büyük benzerlik olmalıdır (Bu benzerlik yukarıda tanımlanan analiz koşullarında 370 nm'de tespit sırasında görülebilir.) (Şekil 1'e bakınız).

7. Bir pastis için karakteristik kromatogram



Şekil 1. 'Pastis' içerisinde bulunan kalkonların varlığını gösteren ve yukarıda tarif edilen metotla elde edilen kromatogram. Pik 1-8 kalkonlar ve pik 9 gilisirhizik asittir.

8. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları:

Aşağıdaki tablo, pastis ve anason aromalı yüksek alkollü içkilerde kalkonların bulunup bulunmadığını belirlemek için performansı verir.

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metod performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1998

Laboratuvar sayısı 14

Numune sayısı 11

Analit Kalkonlar

Numuneler	A	B	C	D	E	F
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	14	14	14	14	14	13
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	–	–	–	–	–	1(*)
Kabul edilen sonuç sayısı	28	14	14	28	28	26
Kalkonların varlığını gösteren sonuçların sayısı	28	14	14	0	28	0
Kalkonların yokluğunu gösteren sonuçların sayısı	0	0	0	28	0	26
Doğru sonuçların yüzdesi (%)	100	100	100	100	100	100
(*) İki tekrar arasındaki tutarsız sonuçlar, numune alma hatası ile ilgili						

Numuneler	G	H	I	J	K
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	14	14	14	14	14
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	–	–	–	–	–
Kabul edilen sonuç sayısı	28	14	14	28	28
Kalkonların varlığını gösteren sonuçların sayısı	0	0	0	0	0
Kalkonların yokluğunu gösteren sonuçların sayısı	28	14	14	28	28
Doğru sonuçların yüzdesi (%)	100	100	100	100	100
Numune türleri					
A pastis, kör tekrarlar					
B pastis, tek numune					

C pastis, tek numune

D 'pastis' (kalkonları içermeyen), kör tekrarlar

E 'pastis' (kalkonları içermeyen), kör tekrarlar

F anason aromalı likör (kalkonları içermeyen), kör tekrarlar

G anason aromalı likör (kalkonları içermeyen), kör tekrarlar

H ouzo (kalkonları içermeyen), tek numune

I ouzo (kalkonları içermeyen), tek numune

J anis (kalkonları içermeyen), kör tekrarlar

K 'pastis' (kalkonları içermeyen), kör tekrarlar

Ek-7

DİSTİLE ALKOLLÜ İÇKİLERDE YUMURTA SARISI KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ - FOTOMETRİK METOT

1. Kapsam

Bu metot, yumurta likörü ve yumurtalı likörde 40-250 g/L arasındaki yumurta sarısı konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılır.

2. Prensip

Yumurta sarısında bulunan, etil alkolde çözünebilir fosfor bileşikler ekstrakte edilir ve fosfor molibdat bileşiği olarak fotometrik metot ile analiz edilir.

3. Reaktifler ve materyaller

Analizlerde kullanılacak su, TS EN ISO 3696'da tanımlanmıştır.

- 3.1. İki kere distile edilmiş su
- 3.2. Diyatome toprağı
- 3.3. Hacimce %96'lık etil alkol (CAS 64-17-5)
- 3.4. %15'lik magnezyum asetat çözeltisi (CAS 16674-78-5)
- 3.5. %10'luk sülfürik asit (CAS 7664-93-9)
- 3.6. 1 N sülfürik asit
- 3.7. 0,16 g/L potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi (CAS 778-77-0), KH_2PO_4
- 3.8. Fosfat belirleme reaktifi:

20 g amonyum molibdat (CAS 12054-85-2) $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, 50 °C'de 400 mL su içerisinde çözdürülür. Başka bir kaptaki, 1 g amonyum vanadat (CAS 7803-55-6) (NH_4VO_3) , 300 mL sıcak su içerisinde çözdürülür, soğutulur ve sonra 140 mL derişik nitrik asit (CAS 7697-37-2) eklenir. Soğumuş olan çözeltiler 1000 mL'lik balon jodede birleştirilir ve hacim 1000 mL'ye tamamlanır.

4. Araç ve gereçler

- 4.1. Erlen, 100 mL'lik
- 4.2. Ultrasonik banyo ya da magnetik karıştırıcı
- 4.3. Balon joje, 100 mL'lik
- 4.4. Su banyosu, 20 °C'ye ayarlanabilir
- 4.5. Filtre (Whatman No 4 ya da eşdeğer)
- 4.6. Porselen (ya da platin) kroze
- 4.7. Kaynar su banyosu
- 4.8. Isı plakası
- 4.9. Kül fırını
- 4.10. 50 mL'lik balon joje
- 4.11. 20 mL'lik balon joje
- 4.12. 420 nm'de ölçüm yapabilen spektrofotometre
- 4.13. 1 cm'lik küvet

5. Numune

Numuneler, analiz öncesi oda sıcaklığında saklanır.

6. İşlem

- 6.1. Numune hazırlama
 - 6.1.1. 100 mL'lik erlen (4.1) içerisinde 10 g numune tartılır.

6.1.2. 70 mL etil alkol (3.3) küçük miktarlarda yavaş yavaş eklenir, her bir eklemede döndürülerek karıştırılır ve 15 dakika süresince ultrasonik banyoya (4.2) yerleştirilir (ya da oda sıcaklığında 10 dakika süresince magnetik karıştırıcı ile karıştırılır).

6.1.3. Erlenin içeriği etil alkol (3.3) ile yıkanarak 100 mL'lik balon jöjeye (4.3) aktarılır. Etil alkol ile hacmi tamamlanır ve 20 °C'deki su banyosuna (4.4) yerleştirilir. 20°C'de hacmi tamamlanır.

6.1.4. Az miktarda diyatome toprağı (3.2) eklenir ve ilk 20 mL atılmak suretiyle filtre (4.5) edilir.

6.1.5. Süzütünün 25 mL'si porselen (ya da platin) krozeeye (4.6) aktarılır. Daha sonra filtrat, %15'lik magnezyum asetat çözeltisinden (3.4) 5 mL eklenerek kaynar su banyosunda (4.7) yavaş yavaş evapore edilerek konsantre edilmelidir.

6.1.6. Krozeler ısı plakası (4.8) üzerine yerleştirilir ve kuruyana kadar ısıtılır.

6.1.7. Isıtma sonucu kalan kısım, beyaz renkte kül elde edilene kadar akkor hale gelmiş kül fırınında (4.9) 600 °C'de bekletilir (En az 1,5 saat ancak bir gece boyunca bırakılabilir).

6.1.8. Kül, 10 mL %10'luk sülfürik asit (3.5) ile alınır ve distile su (3.1) ile yıkanarak 50 mL'lik balon jöjeye (4.10) aktarılır ve distile su ile oda sıcaklığında hacmi tamamlanır. Bu kül çözeltisinin 5 mL'si, fotometrik fosfat analizi için numune çözeltisi hazırlamada kullanılır.

6.2. Fotometrik fosfat analizi

6.2.1. Karşılaştırma çözeltisi

6.2.1.1. %10'luk sülfürik asit (3.5) çözeltisinden 10 mL alınarak, 50 mL'lik balon jöjeye (4.10) aktarılır ve distile su (3.1) ile hacmi tamamlanır.

6.2.1.2. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 20 mL'lik balon jöjeye (4.11) aktarılır, 1 mL 1 N sülfürik asit (3.6) ve 2 mL fosfat reaktifi (3.8) eklenir ve distile su (3.1) ile 20 mL'ye tamamlanır.

6.2.1.3. Kapağı gevşek bir biçimde kapatılır, çalkalanır ve kaynar su banyosunda (4.7) 10 dakika süresince ısıtılır. Daha sonra 20 °C'deki su banyosunda (4.4) 20 dakika soğutulur.

6.2.1.4. 1 cm'lik küvet (4.13), bu karşılaştırma çözeltisi ile doldurulur.

6.2.2. Numune çözeltisi

6.2.2.1. Kül çözeltisinden (6.1.8) 5 mL alınır ve 20 mL'lik balon jöjeye (4.11) aktarılır. 1 mL 1 N sülfürik asit (3.6) ve 2 mL fosfat reaktifi (3.8) eklenir ve distile su (3.1) ile 20 mL'ye tamamlanır.

6.2.2.2. Kapağı kapatılır, çalkalanır ve kaynar su banyosunda (4.7) 10 dakika süresince ısıtılır. Daha sonra 20 °C'deki su banyosunda (4.4) 20 dakika soğutulur.

6.2.2.3. Oluşan sarı çözeltinin, karşılaştırma çözeltisine karşılık 420 nm'de 1 cm'lik küvette hemen spektrofotometrik (4.12) okuması yapılır.

6.2.3. Kalibrasyon eğrisi

6.2.3.1. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, fosfat reaktifinden (3.8) 2 mL'lik hacimler alınarak 20 mL'lik balon jöjelere (4.11) aktarılır. Her birine 1 mL 1 N sülfürik asit (3.6) ve sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mL potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi (3.7) eklenir ve distile su (3.1) ile hacimleri 20 mL'ye tamamlanır.

6.2.3.2. Kapağı gevşek bir biçimde kapatılır, çalkalanır ve kaynar su banyosunda (4.7) 10 dakika süresince ısıtılır. Daha sonra 20 °C'deki su banyosunda (4.4) 20 dakika soğutulur. Karşılaştırma çözeltisine karşılık 420 nm'de 1 cm'lik küvette hemen spektrofotometrik (4.12) okuması yapılır.

6.2.3.3. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması:

Dihidrojen fosfat çözeltisi (mL)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

7. Sonuçların ifade edilmesi

Yumurta sarısı içeriği, g/L olarak aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$\text{g/L yumurta sarısı} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times [(110 \times \text{yoğunluk}) / (E/40)]$$

Burada;

110: Yumurta sarısının 100 g'ında "g" olarak toplam P₂O₅ için çevrim faktörünü,
mg P₂O₅: Kalibrasyon eğrisinden belirlenen değeri,
Yoğunluk: 20 °C'de yumurta bazlı likörün birim hacim başına kütesini (g/mL),
E: Yumurta bazlı likörün "g" olarak ağırlığını,
40: Kül çözeltisinin 5 mL'lik kısmı için seyreltme faktörünü
ifade eder.

8. Metot performans karakteristikleri (kesinlik)

Laboratuvarlararası analizin istatistiksel sonuçları:

Aşağıdaki tablolar yumurta sarısı için değerleri verir.

Aşağıdaki veriler, uluslararası kabul görmüş prosedürler için yürütülen uluslararası metot performans çalışmasından elde edilmiştir.

Laboratuvarlararası analiz yılı 1998

Laboratuvar sayısı 24

Numune sayısı 5

Analit Yumurta sarısı

Numuneler	A	B	C	D	E
Aykırı değer gösteren laboratuvarların çıkarılmasından sonra kalan laboratuvar sayısı	19	20	22	20	22
Aykırı değer gösteren laboratuvar sayısı	3	4	2	4	2
Kabul edilen sonuç sayısı	38	40	44	40	44
Ortalama değer (\bar{x}), µg/g	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S _r) g/L,	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Tekrar edilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD _r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Tekrar edilebilirlik sınırı (r), g/L	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan standart sapma (S _R), g/L	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Yeniden üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapma (RSD _R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Yeniden üretilebilirlik sınırı (R), g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Numune türleri

A Advokat; kör tekrarlar

B Advokat; kör tekrarlar

C Advokat; kör tekrarlar

D Advokat (seyreltilmiş); split oranı (*)

E Advokat; kör tekrarlar