

II

(Akty o charakterze nieustawodawczym)

ROZPORZĄDZENIA

ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) 2016/635

z dnia 22 kwietnia 2016 r.

zmieniające załącznik do rozporządzenia (WE) nr 2870/2000 w odniesieniu do niektórych metod referencyjnych dla analizy napojów spirytusowych

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 110/2008 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 15 stycznia 2008 r. w sprawie definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 1576/89 ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 28 ust. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2870/2000 ⁽²⁾ zawiera wykaz i opis metod referencyjnych dla analizy napojów spirytusowych. Niektóre z metod wymienionych w załączniku do tego rozporządzenia, między innymi metody oznaczania kwasowości lotnej i łącznej zawartości cukrów w napojach spirytusowych, nie są jednak jeszcze opisane.
- (2) Metody oznaczania kwasowości lotnej i łącznej zawartości cukrów w określonych napojach spirytusowych były przedmiotem dwóch międzynarodowych badań potwierdzających przeprowadzonych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami, a parametry wydajnościowe zastosowanej w nich metody uznano za dopuszczalne. Wspomniane badania stanowiły część projektu badawczego realizowanego w ramach programu Komisji Europejskiej Ramy IV: Standardy, pomiary i testowanie (ang. Framework IV Standards Measurements and Testing (SMT)). Dlatego też opis tych metod należy włączyć do załącznika do rozporządzenia (WE) nr 2870/2000.
- (3) W rozporządzeniu (WE) nr 110/2008 określa się wymogi w odniesieniu do niektórych kategorii napojów spirytusowych leżakujących w drewnie i stanowi się, że napoje z innych kategorii również mogą zostać poddane takiemu leżakowaniu. Analiza głównych związków pochodzących z drewna może być pomocna przy rozważaniu, czy próbka jest zgodna z definicją odpowiadającą właściwej kategorii napoju spirytusowego. Międzynarodowa Organizacja ds. Winorośli i Wina (OIV) uznała metodę analizy służącą oznaczaniu tych związków w swojej rezolucji OIV/OENO 382A/2009. Uznanie tej metody opierało się na danych uzyskanych ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych na różnych napojach spirytusowych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami. W związku z tym należy dodać tę metodę i jej opis do unijnych metod referencyjnych dla analizy napojów spirytusowych określonych w załączniku do rozporządzenia (WE) nr 2870/2000.
- (4) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 2870/2000.
- (5) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu ds. Napojów Spirytusowych,

⁽¹⁾ Dz.U. L 39 z 13.2.2008, s. 16.

⁽²⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2870/2000 z dnia 19 grudnia 2000 r. ustanawiające wspólnotowe metody referencyjne dla analizy napojów spirytusowych (Dz.U. L 333 z 29.12.2000, s. 20).

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 2870/2000 wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie trzeciego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 22 kwietnia 2016 r.

W imieniu Komisji
Jean-Claude JUNCKER
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 2870/2000 wprowadza się następujące zmiany:

1) w spisie treści wprowadza się następujące zmiany:

a) w pkt III.3 i VIII skreśla się termin „(p.m.)”;

b) dodaje się punkt w brzmieniu:

„X. Oznaczanie związków występujących w drewnie: furfuralu, 5-hydroksymetylofurfuralu, 5-metylofurfuralu, waniliny, aldehydu syringowego, aldehydu koniferylowego, aldehydu sinapylowego, kwasu galusowego, kwasu elagowego, kwasu wanilinowego, kwasu syringowego i skopoletyny.”;

2) w rozdziale III dodaje się część w brzmieniu:

„III.3. OZNACZANIE KWASOWOŚCI LOTNEJ NAPOJÓW SPIRYTUSOWYCH

1. **Zakres**

Niniejsza metoda została potwierdzona w międzylaboratoryjnym badaniu porównawczym przeprowadzonym w odniesieniu do rumu, brandy, okowity z wyłoków z winogron i okowity z wyłoków z owoców na poziomach 30–641 mg/l.

2. **Odniesienia normatywne**

ISO 3696:1987 Woda do zastosowań w laboratorium analitycznym – specyfikacje i metody testów

3. **Definicje**

3.1. Kwasowość lotną oblicza się, odejmując kwasowość stałą od kwasowości ogólnej.

3.2. Kwasowość ogólna jest sumą kwasowości potencjalnych.

3.3. Kwasowość stała oznacza kwasowość pozostałości po odparowaniu napoju spirytusowego do sucha.

4. **Zasada**

Kwasowość ogólną i kwasowość stałą określa się przez miareczkowanie lub metodą potencjometryczną.

5. **Odczynniki i materiały**

W trakcie analizy, o ile nie zostało to inaczej określone, używać wyłącznie odczynników o rozpoznanym stopniu analitycznym oraz wody o przynajmniej 3 stopniu czystości, zgodnie z definicją ISO 3696:1987.

5.1. Roztwór wodorotlenku sodu (NaOH) o stężeniu 0,01 M

5.2. Roztwór wskaźnika mieszanego:

Odważyć 0,1 g indygotyny i 0,1 g czerwieni fenolowej.

Rozpuścić w 40 ml wody i uzupełnić etanolem do 100 ml.

6. **Aparatura i wyposażenie**

Pośrednia aparatura laboratoryjna, szkło laboratoryjne klasy A oraz następujące wyposażenie:

6.1. Pompka wodna

- 6.2. Wyparka obrotowa lub łaźnia ultradźwiękowa
- 6.3. Wyposażenie do miareczkowania potencjometrycznego (opcjonalnie)

7. **Pobieranie próbek i próbki**

Próbki są przechowywane przed analizą w temperaturze pokojowej.

8. **Procedura**

8.1. Kwasowość ogólna

8.1.1. Przygotowanie próbki

Napój spirytusowy zostaje poddany napromieniowaniu ultradźwiękowemu (sonikacji) lub jest mieszany przez dwie minuty w warunkach próżni w celu pozbycia się dwutlenku węgla, jeżeli jest to wymagane.

8.1.2. Miareczkowanie

Wprowadzić pipetą 25 ml alkoholu do kolby stożkowej o pojemności 500 ml.

Dodać około 200 ml schłodzonej, przegotowanej wody destylowanej (przygotowywanej świeżo codziennie) i 2–6 kropeł roztworu wskaźnika mieszanego (5.2).

Miareczkować roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 0,01 M (5.1) do zmiany zabarwienia z żółtzielonego na fioletowe w przypadku alkoholi bezbarwnych i z żółtobrazowego na czerwobrazowe w przypadku alkoholi o brązowej barwie.

Miareczkowanie można również przeprowadzić metodą potencjometryczną do pH 7,5.

Przyjmijmy, że $n_{1\text{ ml}}$ oznacza dodaną objętość roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,01 M.

8.1.3. Obliczanie

Kwasowość ogólna (KO) wyrażona w miliekwiwalentach na litr napoju spirytusowego jest równa $0,4 \times n_1$.

Kwasowość ogólna (KO) wyrażona w mg kwasu octowego na litr napoju spirytusowego jest równa $24 \times n_1$.

8.2. Kwasowość stała

8.2.1. Przygotowanie próbki

Odparować 25 ml alkoholu do sucha:

Wprowadzić pipetą 25 ml alkoholu na płaskodenną cylindryczną szalkę do odparowywania o średnicy 55 mm. W trakcie pierwszej godziny odparowywania szalka do odparowywania umiejscowiona jest na pokrywie łaźni wodnej, tak by plyn się nie gotował, gdyż mogłoby to spowodować straty poprzez rozpryskiwanie.

Zakończyć suszenie poprzez umiejscowienie szalki do odparowywania w suszarce o temperaturze 105 °C na dwie godziny. Pozwolić, by szalka do odparowywania ostygła w eksykatorze.

8.2.2. Miareczkowanie

Rozpuścić pozostałość po odparowywaniu w schłodzonej, przegotowanej wodzie destylowanej (przygotowywanej świeżo codziennie) i uzupełnić objętość do około 100 ml oraz dodać 2–6 kropeł roztworu wskaźnika mieszanego (5.2).

Miareczkować roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 0,01 M (5.1).

Miareczkowanie można również przeprowadzić metodą potencjometryczną do pH 7,5.

Przyjmijmy, że $n_{2\text{ ml}}$ oznacza dodaną objętość roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,01 M.

8.2.3. Obliczanie

Kwasowość stała (KS) wyrażona w miliekwiwalentach na litr napoju spirytusowego jest równa $0,4 \times n_2$.

Kwasowość stała (KS) wyrażona w mg kwasu octowego na litr napoju spirytusowego jest równa $24 \times n_2$.

9. Obliczenie kwasowości lotnej

9.1. Wyrażona w miliekwiwalentach na litr:

Przyjmijmy, że:

KO = kwasowość ogólna w miliekwiwalentach na litr

KS = kwasowość stała w miliekwiwalentach na litr

kwasowość lotna, KL, w miliekwiwalentach na litr jest równa:

$$KO - KS$$

9.2. Wyrażona w mg kwasu octowego na litr:

Przyjmijmy, że:

KO' = kwasowość ogólna w mg kwasu octowego na litr

KS' = kwasowość stała w mg kwasu octowego na litr:

Kwasowość lotna, KL, w mg kwasu octowego na litr jest równa:

$$KO' - KS'$$

9.3. Wyrażona w g kwasu octowego na hektolitr czystego alkoholu 100 % obj. jest równa: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

gdzie A oznacza objętościową zawartość alkoholu w napoju spirytusowym.

10. Charakterystyka wydajnościowa metody (precyzja)

10.1. Wyniki statystyczne badania międzylaboratoryjnego.

Poniższe dane zostały uzyskane ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami [1] [2].

Rok badania międzylaboratoryjnego	2000
Liczba laboratoriów	18
Liczba próbek	6

Próbki	A	B	C	D	E	F
Liczba laboratoriów pozostała po eliminacji wartości odstających	16	18	18	14	18	18
Liczba wartości odstających (laboratoriów)	2			4		
Liczba przyjętych wyników	32	36	36	28	36	36
Wartość średnia [mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD _r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Granica powtarzalności, r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD _R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Granica odtwarzalności, R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Rodzaje próbek:

A Okowita ze śliwek, poziom rozdzielony*

B Rum I, ślepe duplikaty

C Rum II, poziom rozdzielony*

D Śliwowica, ślepe duplikaty

E Brandy, ślepe duplikaty

F Okowita z wytloków, ślepe duplikaty

[1] Horwitz, W. (1995), »Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies«, [w:] Pure and Applied Chemistry 67, s. 332–343.

[2] Horwitz, W. (1982), Analytical Chemistry 54, s. 67 A–76 A.”;

3) dodaje się rozdział VIII w brzmieniu:

„VIII. ŁĄCZNA ZAWARTOŚĆ CUKRÓW

1. Zakres

Metoda HPLC–RI ma zastosowanie do oznaczania łącznej zawartości cukrów (wyrażonej jako cukier inwertowany) w napojach spirytusowych, z wyłączeniem likierów zawierających produkty jajeczne i mleczne.

Niniejsza metoda została potwierdzona w międzylaboratoryjnym badaniu porównawczym przeprowadzonym w odniesieniu do anyżówki (pastisu), anisu destylowanego, likieru wiśniowego, likieru z (nazwa owocu lub użytego surowca) i crème de cassis na poziomach 10,86–509,7 g/l. Liniowość reakcji przyrządu została jednak dowiedziona w odniesieniu do stężeń z zakresu 2,5–20,0 g/l.

Niniejsza metoda nie służy do oznaczania niskich poziomów cukrów.

2. Odniesienia normatywne

ISO 3696:1987 Woda do zastosowań w laboratorium analitycznym – specyfikacje i metody testów

3. Zasada

Analizy płynnego cukru przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w celu określenia zawartości w nim stężenia glukozy, fruktozy, sacharozy, maltozy i laktozy.

W ramach niniejszej metody wykorzystuje się alkiloaminową fazę stacjonarną i wykrywanie z zastosowaniem refraktometrii różnicowej i metoda ta została przedstawiona jako przykład. Zastosowanie żywicy anionowymiennej jako fazy stacjonarnej również byłoby możliwe.

4. Odczynniki i materiały

- 4.1. Glukoza (CAS 50-99-7) o czystości co najmniej 99 %.
- 4.2. Fruktaza (CAS 57-48-7) o czystości co najmniej 99 %.
- 4.3. Sacharaza (CAS 57-50-1) o czystości co najmniej 99 %.
- 4.4. Laktoza (CAS 5965-66-2) o czystości co najmniej 99 %.
- 4.5. Monohydrat maltozy (CAS 6363-53-7) o czystości co najmniej 99 %.
- 4.6. Czysty cyjanek metylu (CAS 75-05-8) do celów analizy HPLC.
- 4.7. Woda destylowana lub dejonizowana, najlepiej mikrofiltrowana.

4.8. Rozpuszczalniki (przykład)

Eluent składa się z:

75 części objętościowych cyjanku metylu (4.6),

25 części objętościowych wody destylowanej (4.7).

Przepuszczać przez niego hel w wolnym tempie przez 5–10 minut, zanim zostanie wykorzystany do odgazowania.

Jeżeli używana woda nie była poddana mikrofiltracji, zaleca się przefiltrowanie rozpuszczalnika przez filtr dla rozpuszczalników organicznych o wielkości porów mniejszej lub równej 0,45 µm.

- 4.9. Etanol absolutny (CAS 64-17-5).
- 4.10. Roztwór etanolu (5 %, v/v).
- 4.11. Przygotowanie podstawowego roztworu wzorcowego (20 g/l)

Odważyć po 2 g każdego z cukrów, który ma zostać poddany analizie (4.1–4.5), przenieść je bez strat do kolby miarowej o pojemności 100 ml. (Uwaga: 2,11 g monohydratu maltozy odpowiada 2 g maltozy).

Uzupełnić do 100 ml roztworem alkoholu 5 % obj. (4.10), wstrząsnąć i przechowywać w temperaturze około + 4 °C. Przygotowywać nowy roztwór podstawowy raz w tygodniu.

4.12. Przygotowanie roboczych roztworów wzorcowych (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 i 20,0 g/l)

Odpowiednio rozcieńczyć roztwór podstawowy, 20 g/l, (4.11) roztworem alkoholu 5 % obj. (4.10), tak aby otrzymać pięć roboczych roztworów wzorcowych o gęstości 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 i 20,0 g/l. Przefiltrować przez filtr o wielkości porów mniejszej lub równej 0,45 µm (5.3).

5. Aparatura i wyposażenie

5.1. System HPLC wystarczający do uzyskania rozdzielczości odniesienia w odniesieniu do wszystkich cukrów.

5.1.1. Wysokosprawny chromatograf cieczowy wyposażony w 6-portowy zawór wtryskowy z pętlą 10 μL lub jakiegokolwiek inne urządzenie, zarówno automatyczne, jak i ręczne, w celu niezawodnego wtryskiwania mikroobjętości.

5.1.2. System pompowania umożliwiający z wielką dokładnością uzyskanie i utrzymanie stałego lub zaprogramowanego natężenia przepływu.

5.1.3. Refraktometr różnicowy

5.1.4. Integратор lub rejestrator obliczeniowy, kompatybilny z pozostałymi elementami systemu.

5.1.5. Przedkolumna:

Zaleca się dołączenie odpowiedniej przedkolumny do kolumny analitycznej.

5.1.6. Kolumna (przykład):

Materiał: stal nierdzewna lub szkło.

Średnica wewnętrzna: 2–5 mm.

Długość: 100–250 mm (w zależności od wielkości cząstek wypełniających), na przykład 250 mm w przypadku cząstek o średnicy 5 μm .

Faza stacjonarna: alkiloaminowe grupy funkcyjne związane z krzemionką, maksymalny rozmiar cząstek: 5 μm .

5.1.7. Warunki chromatografii (przykład):

Eluent (4.8), natężenie przepływu: 1 ml/min.

Wykrywanie: refraktometr różnicowy.

Aby zapewnić doskonałą stabilność detektora, należy go włączyć na kilka godzin przed użyciem. Komora odniesienia musi być wypełniona eluentem.

5.2. Waga analityczna o dokładności do 0,1 mg.

5.3. Układ filtracyjny dla małych objętości wykorzystujący mikromembranę o wielkości porów 0,45 μm .

6. Przechowywanie próbek

Po otrzymaniu próbki należy przechowywać w temperaturze pokojowej, dopóki nie zostaną wykorzystane do analizy.

7. Procedura

7.1. CZĘŚĆ A: Przygotowanie próbek

7.1.1. Wstrząsnąć próbkę.

7.1.2. Przefiltrować próbkę przez filtr o wielkości porów mniejszej lub równej 0,45 μm (5.3).

7.2. CZĘŚĆ B: HPLC

7.2.1. Oznaczanie

Wstrzyknąć 10 μl roztworów wzorcowych (4.12) i próbek (7.1.2). Przeprowadzić analizę przy zastosowaniu warunków chromatografii, na przykład warunków opisanych powyżej.

- 7.2.2. W przypadku gdyby jakikolwiek pik próbki miał większą powierzchnię (lub wysokość) niż odpowiadający mu pik w roztworze wzorcowym o największym stężeniu, wówczas należy rozcieńczyć próbkę wodą destylowaną i poddać ponownej analizie.

8. Obliczanie

Porównać oba chromatogramy uzyskane w odniesieniu do roztworu wzorcowego i napoju spirytusowego. Zidentyfikować piki na podstawie ich czasów retencji. Przeprowadzić pomiary ich powierzchni (lub wysokości) i obliczyć stężenia zgodnie z metodą standardu zewnętrznego. Wziąć pod uwagę wszelkie rozcieńczenia próbki.

Wynik końcowy jest sumą sacharozy, maltozy, laktozy, glukozy i fruktozy wyrażoną jako cukier inwertowany w g/l.

Cukier inwertowany oblicza się jako sumę wszystkich obecnych monosacharydów i disacharydów redukujących oraz stechiometrycznej ilości glukozy i fruktozy obliczonej na podstawie obecnej sacharozy.

$$\text{Cukier inwertowany (g/l)} = \text{glukoza (g/l)} + \text{fruktoza (g/l)} + \text{maltoza (g/l)} + \text{laktoza (g/l)} + (\text{sacharoza (g/l)} \times 1,05)$$

$$1,05 = (\text{masa cząsteczkowa fruktozy} + \text{masa cząsteczkowa glukozy}) / \text{masa cząsteczkowa sacharozy}$$

9. Charakterystyka wydajnościowa metody (precyzja)

9.1. Wyniki statystyczne badania międzylaboratoryjnego.

Poniższe dane zostały uzyskane ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami [1] [2].

Rok badania międzylaboratoryjnego 2000

Liczba laboratoriów 24

Liczba próbek 8

[1] Horwitz, W. (1995), »Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies«, [w:] Pure and Applied Chemistry 67, s. 332–343.

[2] Horwitz, W. (1982), Analytical Chemistry 54, s. 67 A–76 A.

Tabela 1

Fruktoza, glukoza, maltoza

Analit	Fruktoza		Glukoza			Maltoza	
	Crème de Cassis	Roztwór wzorcowy (50 g/l)	Napój spirytusowy aromatyzowany anyżkiem	Crème de Cassis	Roztwór wzorcowy (50 g/l)	Napój spirytusowy aromatyzowany anyżkiem	Roztwór wzorcowy (10 g/l)
Wartość średnia [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Liczba laboratoriów bez wartości odstających	21	22	21	23	19	21	22
Odchylenie standardowe powtarzalności, s _r [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analit	Fruktoza		Glukoza			Małtoza	
	Crème de Cassis	Roztwór wzorcowy (50 g/l)	Napój spirytusowy aromatyzowany anyżkiem	Crème de Cassis	Roztwór wzorcowy (50 g/l)	Napój spirytusowy aromatyzowany anyżkiem	Roztwór wzorcowy (10 g/l)
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Granica powtarzalności, r [g/l] ($r = 2,8 \times sr$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Odchylenie standardowe od-twarzalności, s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Względne odchylenie stan-dardowe od-twarzalności, RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times sR$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabela 2

Sacharoza

Analit	Sacharoza					
	Pastis	Ouzo	Likier wiśniowy	Likier miętowy	Crème de Cassis	Roztwór wzorcowy (100 g/l)
Wartość średnia [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Liczba laboratoriów bez wartości odstających	19	19	20	18	18	18
Odchylenie standardowe po-wtarzalności, s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Względne odchylenie stan-dardowe powtarzalności, RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Granica powtarzalności, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Odchylenie standardowe od-twarzalności, s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Względne odchylenie stan-dardowe od-twarzalności, RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) Poziom rozdzielony.

Tabela 3

Łączna zawartość cukrów

(Uwaga: Podane dane obliczono w odniesieniu do łącznej zawartości cukrów, a nie w odniesieniu do cukru inwertowanego, jak określono w sekcji 8 powyżej.)

Próbki	Pastis	Ouzo	Napój spirytusowy aromatyzowany anyżkiem	Likier wiśniowy	Likier miętowy	Crème de Cassis	Roztwór wzorcowy (220 g/l)
Wartość średnia [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Liczba laboratoriów bez wartości odstających	20	19	20	20	18	18	19
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Granica powtarzalności, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) Poziom rozdzielony."

4) dodaje się rozdział X w brzmieniu:

„X. **OZNACZANIE W NAPOJACH SPIRYTUSOWYCH NASTĘPUJĄCYCH ZWIĄZKÓW WYSTĘPUJĄCYCH W DREWNI METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC): FURFURALU, 5-HYDROKSYMETYLOFURFURALU, 5-METYLOFURFURALU, WANILINY, ALDEHYDU SYRYNGOWEGO, ALDEHYDU KONIFERYLOWEGO, ALDEHYDU SINAPYLOWEGO, KWASU GALUSOWEGO, KWASU ELAGOWEGO, KWASU WANILINOWEGO, KWASU SYRYNGOWEGO I SKOPOLETYNY**

1. **Zakres**

Niniejsza metoda dotyczy oznaczania furfuralu, 5-hydroksymetylofurfuralu, 5-metylofurfuralu, waniliny, aldehydu syryngowego, aldehydu koniferylowego, aldehydu sinapylowego, kwasu galusowego, kwasu elagowego, kwasu wanilinowego, kwasu syryngowego i skopoletyny metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

2. **Odniesienie normatywne**

Metoda analityczna uznana przez Ogólne Zgromadzenie Międzynarodowej Organizacji ds. Wina i Winorośli (OIV) i opublikowane przez OIV pod numerem referencyjnym OIV-MA-BS-16: R2009.

3. **Zasada**

Oznaczanie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z wykrywaniem za pomocą spektrofotometrii w nadfiolecie na szeregu długości fal i za pomocą spektrofлуorometrii.

4. Odczynniki

Odczynniki muszą posiadać czystość analityczną. Woda wykorzystywana musi być wodą destylowaną lub wodą o co najmniej równorzędnej czystości. Zaleca się stosowanie wody mikrofiltrowanej o rezystywności 18,2 M Ω .cm.

- 4.1. Alkohol 96 % obj.
- 4.2. Metanol o czystości HPLC (rozpuszczalnik B).
- 4.3. Kwas octowy rozcieńczony do 0,5 % obj. (rozpuszczalnik A).
- 4.4. Fazy ruchome: (podano jedynie przykład).

Rozpuszczalnik A (0,5-procentowy kwas octowy) i rozpuszczalnik B (czysty metanol). Przefiltrować przez membranę (o porowatości 0,45 μ m). W razie potrzeby odgazować w łaźni ultradźwiękowej.

- 4.5. Roztwory wzorcowe o minimalnej czystości 99 %: furfural, 5-hydroksymetylofurfural, 5-metylofurfural, wanilina, aldehyd syringowy, aldehyd koniferylowy, aldehyd sinapylowy, kwas galusowy, kwas elagowy, kwas wanilinowy, kwas syringowy i skopoletyna.
- 4.6. Roztwór referencyjny: substancje wzorcowe rozpuszcza się w roztworze wodno-alkoholowym 50 % obj. Końcowe stężenia w roztworze referencyjnym powinny być następujące:

furfural: 5 mg/l; 5-hydroksymetylofurfural: 10 mg/l; 5-metylofurfural 2 mg/l; wanilina: 5 mg/l; aldehyd syringowy: 10 mg/l; aldehyd koniferylowy: 5 mg/l; aldehyd sinapylowy: 5 mg/l; kwas galusowy: 10 mg/l; kwas elagowy: 10 mg/l; kwas wanilinowy: 5 mg/l; kwas syringowy: 5 mg/l; skopoletyna: 0,5 mg/l.

5. Aparatura

Standardowa aparatura laboratoryjna

- 5.1. Wysokosprawny chromatograf ciekłowy, który może funkcjonować w trybie dwuskładnikowego gradientu i który jest wyposażony w:
 - 5.1.1. Detektor spektrofotometryczny, który może być wykorzystywany do dokonywania pomiarów przy długości fal 260–340 nm. Zaleca się jednak korzystanie z detektora różnych długości fal z matrycą fotodiodową lub podobną w celu potwierdzenia czystości pików.
 - 5.1.2. Detektor spektrofluorymetryczny – długość fali wzbudzenia: 354 nm, długości fali emisji: 446 nm (do celów oznaczenia pierwiastków śladowych skopoletyny, które można również wykryć przy długości fali wynoszącej 313 nm za pomocą spektrofotometrii).
 - 5.1.3. Wtryskiwacz, za pomocą którego można wprowadzić (na przykład) 10 lub 20 μ l próbki do badań.
 - 5.1.4. Kolumna do wysokosprawnej chromatografii ciekłowej, typ RP C18, maksymalna wielkość cząsteczek: 5 μ m.
- 5.2. Strzykawki do HPLC.
- 5.3. Urządzenie do przeprowadzenia filtracji membranowej małych objętości.
- 5.4. Integrator lub rejestrator o parametrach zgodnych z całym aparatem, który w szczególności musi posiadać szereg kanałów pozyskiwania.

6. Procedura

- 6.1. Przygotowanie roztworu do wstrzyknięcia.

W razie potrzeby filtruje się roztwór referencyjny i napój spirytusowy przez membranę o maksymalnej średnicy porów wynoszącej 0,45 μ m.

- 6.2. Warunki przeprowadzania chromatografii: przeprowadzić analizę w temperaturze otoczenia przy pomocy aparatury opisanej w pkt 5.1, korzystając z faz ruchomych (4.4) o przepływie wynoszącym około 0,6 ml na minutę, zgodnie z poniższym gradientem (podanym wyłącznie jako przykład).

Czas: 0 min 50 min 70 min 90 min

rozpuszczalnik A (woda–kwasy): 100 % 60 % 100 % 100 %

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

Należy zauważyć, że w niektórych przypadkach powinno się modyfikować ten gradient w celu uniknięcia koelucji.

- 6.3. Oznaczanie

- 6.3.1. Oddzielnie wstrzyknąć roztwory wzorcowe, następnie wymieszać.

Przystosować warunki działania, tak aby czynniki rozdzielczości pików wszystkich związków były równe co najmniej 1.

- 6.3.2. Wstrzyknąć próbkę przygotowaną zgodnie z opisem w pkt 6.1.

- 6.3.3. Zmierzyć powierzchnię pików w roztworze referencyjnym i napoju spirytusowym i obliczyć stężenia.

7. Przedstawienie wyników

Przedstawić stężenie każdego składnika w mg/l.

8. Charakterystyka wydajnościowa metody (precyzja)

Poniższe dane zostały uzyskane w 2009 r. ze studiów wydajnościowych metod międzynarodowych przeprowadzonych na różnych napojach spirytusowych zgodnie z międzynarodowo ustalonymi procedurami [1], [2].

8.1. Furfural

Analit	Furfural					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Próbki						
Liczba uczestniczących laboratoriów	15	15	15	15	15	15
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	14	12	13	14	13	13
Wartość średnia [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analit	Furfural					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_p$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	8	15	5	13	3	5
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-hydroksymetylofurfural

Analit	5-hydroksymetylofurfural					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	16	16	16	16	16	16
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	14	14	14	14	14	14
Wartość średnia [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_p$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-metylofurfural

Analit	5-metylofurfural					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	11	11	11	11	11	11
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	11	11	8	11	10	11
Wartość średnia [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_p [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_p [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_p$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Wanilina

Analit	Wanilina					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	16	15	16	16	16	16
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	16	15	16	16	16	16
Wartość średnia [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_p [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analit	Wanilina					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Aldehyd syringowy

Analit	Aldehyd syringowy					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	16	15	16	16	16	16
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	13	13	13	12	14	13
Wartość średnia [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Aldehyd koniferylowy

Analit	Aldehyd koniferylowy					
	Próbki	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon
Liczba uczestniczących laboratoriów	13	12	13	12	13	13
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	12	12	13	12	13	13
Wartość średnia [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_p [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_p [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_p$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Aldehyd sinapyłowy

Analit	Aldehyd sinapyłowy					
	Próbki	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon
Liczba uczestniczących laboratoriów	14	14	14	14	15	14
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	14	13	12	13	13	12
Wartość średnia [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_p [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analit	Aldehyd sinapylowy					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Kwas galusowy

Analit	Kwas galusowy					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	16	15	16	16	16	16
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	15	14	16	16	16	16
Wartość średnia [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Kwas elagowy

Analit	Kwas elagowy						
	Próbki	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	7	7	7	7	7	7	7
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	7	7	7	7	7	7	6
Wartość średnia [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	13	36
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_p [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,95	0,34
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_p [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	7,4	1,0
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_p$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	2,7	1,0
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	4,9	14
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	44	43	42	39	39	39	40
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	14	40

8.10. Kwas wanilinowy

Analit	Kwas wanilinowy						
	Próbki	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	15	15	15	15	15	15	15
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	12	11	14	14	14	15	14
Wartość średnia [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	0,8	2,4	2,7
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_p [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,10	0,13	0,21

Analit	Kwas wanilinowy					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Kwas syringowy

Analit	Kwas syringowy					
	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	16	15	16	16	16	16
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	16	15	15	15	16	15
Wartość średnia [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Skopoletyna

Analit	Skopoletyna						
	Próbki	Whisky	Brandy	Rum	Koniak 1	Burbon	Koniak 2
Liczba uczestniczących laboratoriów	10	10	10	10	10	10	10
Liczba przyjętych wyników (laboratoriów)	9	8	9	8	8	8	8
Wartość średnia [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15	
Odchylenie standardowe powtarzalności, s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040	
Względne odchylenie standardowe powtarzalności, RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7	
Granica powtarzalności, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011	
Odchylenie standardowe odtwarzalności, s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02	
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności, RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15	
Granica odtwarzalności, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06	

[1] Horwitz, W. (1995), »Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies«, [w:] Pure and Applied Chemistry 67, s. 332–343.

[2] Horwitz, W. (1982), Analytical Chemistry 54, s. 67 A–76 A.”.