

II

(Незаконодателни актове)

РЕГЛАМЕНТИ

РЕГЛАМЕНТ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ (ЕС) 2016/635 НА КОМИСИЯТА

от 22 април 2016 година

за изменение на приложението към Регламент (ЕО) № 2870/2000 по отношение на някои референтни методи за анализ на спиртните напитки

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 110/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 15 януари 2008 г. относно определението, описанието, представянето, етикетиранието и защитата на географските указания на спиртните напитки и за отмяна на Регламент (ЕИО) № 1576/89 на Съвета ⁽¹⁾, и по-специално член 28, параграф 2 от него,

като има предвид, че:

- (1) В Регламент (ЕО) № 2870/2000 на Комисията ⁽²⁾ се изброяват и описват референтните методи за анализ на спиртните напитки. Някои от изброените в приложението към посочения регламент методи обаче още не са описани, сред които методите за определяне на летливата киселинност и на общата захар в спиртните напитки.
- (2) Методите за определяне на летливата киселинност и на общата захар в някои спиртни напитки бяха предмет на две международни изследвания за валидиране, които са извършени в съответствие с международно приети процедури, като параметрите на ефективност на тези методи са счестени за приемливи. Изследванията бяха проведени като част от научноизследователски проект по линия на програмата за стандарти, измервания и изпитвания (SMT) от IV рамкова програма на Европейската комисия. Поради това описанието на тези методи следва да бъде включено в приложението към Регламент (ЕО) № 2870/2000.
- (3) В Регламент (ЕО) № 110/2008 се определят изисквания за някои категории спиртни напитки, които трябва да отлежават в дървени съдове, и предвижда, че други спиртни напитки могат да отлежават по този начин. При преценката дали една проба съответства на определението за съответната категория спиртна напитка може да е полезен анализ на основните съединения, отделящи се от дървесината. В резолюцията си OIV/OENO 382A/2009 Международната организация по лозарство и винарство (OIV) е признала аналитичен метод за определяне на тези съединения. Признаването на метода се основава на данни от международно проучване на ефективността на този метод при различни спиртни напитки, извършено съгласно международно приети процедури. По тази причина този метод и неговото описание следва да бъдат добавени към референтните методи на Съюза за анализ на спиртните напитки, посочени в приложението към Регламент (ЕО) № 2870/2000.
- (4) Поради това Регламент (ЕО) № 2870/2000 следва да бъде съответно изменен.
- (5) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Комитета по спиртни напитки,

⁽¹⁾ ОВ L 39, 13.2.2008 г., стр. 16.

⁽²⁾ Регламент (ЕО) № 2870/2000 на Комисията от 19 декември 2000 г. относно определяне на референтни методи на Общността за анализ на спиртните напитки (ОВ L 333, 29.12.2000 г., стр. 20).

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Приложението към Регламент (ЕО) № 2870/2000 се изменя в съответствие с приложението към настоящия регламент.

Член 2

Настоящият регламент влиза в сила на третия ден след деня на публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави членки.

Съставено в Брюксел на 22 април 2016 година.

За Комисията
Председател
Jean-Claude JUNCKER

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложението към Регламент (ЕО) № 2870/2000 се изменя, както следва:

1) Съдържанието се изменя, както следва:

а) в точки III.3 и VIII текстът „(p.m.)“ се заличава;

б) добавя се следната точка:

„X. Определяне на съединенията, отделящи се от дървесината: фурфурол, 5-хидроксиметилфурфурол, 5-метилфурфурол, ванилин, сирингалдехид, кониферил алдехид, синапалдехид, галова киселина, елагинова киселина, ванилинова киселина, сирингова киселина и скополетин.“

2) В глава III се добавя следната част:

„III.3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛЕТЛИВАТА КИСЕЛИННОСТ НА СПИРТНИТЕ НАПИТКИ

1. **Обхват**

Методът е валидиран в рамките на междулабораторно изпитване за ром, бренди, ракия и плодови спиртни напитки, на нива, които варират от 30 mg/l до 641 mg/l.

2. **Нормативни референции**

ISO 3696: 1987 Вода за аналитични цели — Спецификации и методи на изпитване.

3. **Определения**

3.1. Летливата киселинност се изчислява чрез приспадане на постоянната киселинност от общата киселинност.

3.2. Общата киселинност е сумата от титруемите киселини.

3.3. Постоянната киселинност е киселинността на утайката, останала след изпаряване на спиртната напитка до изсъхване.

4. **Принцип**

Общата киселинност и постоянната киселинност се определят чрез титруване или чрез потенциометрия.

5. **Реактиви и материали**

Освен ако не е постановено друго, по време на анализа се използват само реактиви от призната аналитична категория и вода най-малко от категория 3, съгласно дефиницията на ISO 3696:1987.

5.1. 0,01 M разтвор на натриев хидроксид (NaOH).

5.2. Смесен индикаторен разтвор:

Претеглят се 0,1 g индигокармин и 0,1 g фенолово червено.

Това количество се разтваря в 40 ml вода и се долива до 100 ml с етанол.

6. **Апаратура и оборудване**

Непряка лабораторна апаратура, градуирана стъклария категория А и следното:

6.1. Водна помпа

- 6.2. Ротационен изпарител или ултразвукова вана
- 6.3. Оборудване за потенциометрично титруване (незадължително)

7. Вземане на проби

Преди анализа пробите се съхраняват на стайна температура.

8. Процедура

8.1. Обща киселинност

8.1.1. Приготвяне на пробата за анализ

Ако е необходимо, спиртната напитка се облъчва с ултразвук (ултрасонификация) или се разбърква две минути под вакуум за освобождаването ѝ от въглероден диоксид.

8.1.2. Титруване

25 ml от спиртната напитка се поставят с пипета в 500 ml еrlenмайерова колба.

Добавят се около 200 ml преварена и охладена дестилирана вода (прясно приготвяна всеки ден) и 2–6 капки от смесения индикаторен разтвор (5.2).

Титрува се с 0,01 M разтвор на натриев хидроксид (5.1), докато цветът се промени от жълто-зелено на виолетово (при безцветни спиртни напитки) или от жълто-кафяво на червеникавокафяво (при кафяви спиртни напитки).

Титруването може да се извърши и чрез потенциометрия до pH 7,5.

С n_1 ml се обозначава обемът на добавения 0,01 M разтвор на натриев хидроксид.

8.1.3. Изчисляване

Общата киселинност (ГА), изразена в милиеквиваленти на литър спиртна напитка, е равна на $0,4 \times n_1$.

Общата киселинност (ГА), изразена в mg оцетна киселина на литър спиртна напитка, е равна на $24 \times n_1$.

8.2. Постоянна киселинност

8.2.1. Приготвяне на пробата за анализ

Изпарете 25 ml от спиртната напитка до изсъхване:

25 ml от спиртната напитка се поставят с пипета в цилиндрична изпарителна ваничка с плоско дъно и диаметър 55 mm. По време на първия час на изпаряването изпарителната ваничка се поставя върху капака на кипяща водна баня, така че течността да не заври, тъй като това би довело до загуби чрез разплискване.

Сушенето се завършва, като изпарителната ваничка се поставя в продължение на два часа в пещ за сушене при температура 105 °C. Изпарителната ваничка се оставя да изстине в ексикатор.

8.2.2. Титруване

Утайката, останала след изпаряване, се разтваря в преварена и охладена дестилирана вода (прясно приготвяна всеки ден), долива се до обем от около 100 ml и се добавят 2–6 капки от смесения индикаторен разтвор (5.2).

Титрува се с 0,01 M разтвор на натриев хидроксид (5.1).

Титруването може да се извърши и чрез потенциометрия до рН 7,5.

С n_2 ml се обозначава обемът на добавения 0,01 М разтвор на натриев хидроксид.

8.2.3. Изчисляване

Постоянната киселинност (FA), изразена в милиеквиваленти на литър спиртна напитка, е равна на $0,4 \times n_2$.

Постоянната киселинност (FA), изразена в mg оцетна киселина на литър спиртна напитка, е равна на $24 \times n_2$.

9. Изчисляване на летливата киселинност

9.1. Изразяване в милиеквиваленти на литър:

Нека:

TA = обща киселинност в милиеквиваленти на литър

FA = постоянна киселинност в милиеквиваленти на литър

Летливата киселинност (VA), изразена в милиеквиваленти на литър, е равна на:

$$TA - FA$$

9.2. Изразяване в mg оцетна киселина на литър:

Нека:

TA' = обща киселинност в mg оцетна киселина на литър

FA' = постоянна киселинност в mg оцетна киселина на литър

Летливата киселинност (VA), изразена в mg оцетна киселина на литър, е равна на:

$$TA' - FA'$$

9.3. Изразяване в g оцетна киселина на hl чист 100 об. % алкохол: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

където A е алкохолното съдържание по обем на спиртната напитка.

10. Характеристики на ефективност на метода (прецизност)

10.1. Статистически резултати от междулабораторното изпитване

Следните данни бяха получени в резултат на международно проучване на ефективността на метода, извършено в съответствие с международно приети процедури ⁽¹⁾ ⁽²⁾.

Година на междулабораторното изпитване **2000 г.**

Брой на лабораториите 18

Брой проби 6

Проби	А	Б	В	Г	Д	Е
Брой лаборатории, останали след елиминирани на големите различия в стойностите	16	18	18	14	18	18
Брой на отклоняващите се стойности (лаборатории)	2			4		
Брой приети резултати	32	36	36	28	36	36
Средна стойност (\bar{x}) [mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD _r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Граница на повторяемост r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD _R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Граница на възпроизводимост R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Видове проби:

А дестилат от сливи; проби с приблизително еднакво количество аналит *

Б ром I; неизвестни за оператора паралелни проби

В ром II; проби с приблизително еднакво количество аналит *

Г сливова ракия (Slivovitz); неизвестни за оператора паралелни проби

Д бренди (Brandy) неизвестни за оператора паралелни проби

Е дестилат от джибри; неизвестни за оператора паралелни проби

(¹) „Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies“, Horwitz, W. (1995 г.) Pure and Applied Chemistry 67, стр. 332-343.

(²) Horwitz, W. (1982 г.) Analytical Chemistry 54, стр. 67A-76A.“

3) Въмква се следната глава VIII:

„VIII. ОБЩИ ЗАХАРИ

1. Обхват

Методът HPLC-RI е приложен за определяне на общи захари (изразени като инвертна захар) в спиртните напитки, с изключение на ликьори, които съдържат яйца и млечни продукти.

Методът бе валидиран в междублабораторно изследване за пастис, узо, черешов ликьор, Crème de (последван от наименованието на плод или използваната суровина) и Crème de cassis при концентрации от 10,86 g/l до 509,7 g/l. Линеиността на показанията на измервателния уред обаче бе доказана за концентрационния диапазон от 2,5 g/l до 20,0 g/l.

Настоящият метод не е предназначен за определяне на ниски количества захари.

2. **Нормативни референции**

ISO 3696:1987 Вода за аналитични цели — Спецификации и методи на изпитване.

3. **Принцип**

Анализи чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) на захарни разтвори, с цел да се определят техните концентрации на глюкоза, фруктоза, захароза, малтоза и лактоза.

Този метод е даден като пример, при него като неподвижна фаза се използва алкиламин, а за откриването — диференциален рефрактометър. Като неподвижна фаза може да се използват и анионообменни смоли.

4. **Реактиви и материали**

4.1. Глюкоза (CAS 50-99-7), с чистота най-малко 99 %.

4.2. Фруктоза (CAS 57-48-7), с чистота най-малко 99 %.

4.3. Захароза (CAS 57-50-1), с чистота най-малко 99 %.

4.4. Лактоза (CAS 5965-66-2), с чистота най-малко 99 %.

4.5. Малтоза монохидрат (CAS 6363-53-7), с чистота най-малко 99 %.

4.6. Чист ацетонитрил (CAS 75-05-8) за анализ чрез HPLC.

4.7. Дестилирана или деминерализирана вода, за предпочитане — микрофилтрирана.

4.8. Разтворители (пример)

Разтворителят за елуиране се състои от:

75 обемни части ацетонитрил (4.6),

25 обемни части дестилирана вода (4.7).

Преди употребата в продължение на 5–10 минути се пуска слаба струя хелий през него, за да се дегазира.

Ако използваната вода не е била микрофилтрирана, разтворителят следва да се филтрира с филтър за органични разтворители с максимален размер на порите 0,45 µm.

4.9. Чист етанол (CAS 64-17-5).

4.10. Разтвор на етанол (5 об. %).

4.11. Приготвяне на изходния стандартен разтвор (20 g/l)

Претеглят се по 2 g от всяка от подлежащите на анализ захари (4.1.–4.5.) и се прехвърлят без загуба в мерителна колба от 100 ml. (Бележка: 2,11 g малтоза монохидрат е еквивалентно на 2 g малтоза).

Допълва се с 5 об. % разтвор на етанол (4.10) до 100 ml, разклаща се и се съхранява при температура от около + 4 °C. Нов изходен разтвор се приготвя веднъж седмично.

4.12. Приготвяне на работните стандартни разтвори (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 и 20,0 g/l)

Изходният разтвор, 20 g/l, (4.11) се разрежда с подходящо количество 5 об. % разтвор на етанол (4.10), така че да се получат пет работни стандартни разтвори от 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 и 20,0 g/l. Филтруват се с филтър с максимален размер на порите 0,45 µm (5.3.).

5. Апаратура и оборудване

- 5.1. Система за HPLC, която може да постигне разделяне на базова линия на всички захари
- 5.1.1. Високоэффективен течен хроматограф с шестканален инжекционен клапан с дозираща тръбичка 10 μ l или друго устройство за дозиране, автоматично или ръчно, за надеждното инжектиране на микроколичества
- 5.1.2. Помпена система, позволяваща да се достигне и поддържа постоянна или програмирана скорост на потока с голяма точност
- 5.1.3. Диференциален рефрактометър
- 5.1.4. Изчислителен интегратор или записващо устройство, чиято ефективност на работа е съвместима с останалата част на оборудването
- 5.1.5. Предколони:

Препоръчва се свързването на аналитичната колона с подходяща предколони.

- 5.1.6. Колона (пример):

Материал:	неръждаема стомана или стъкло
Вътрешен диаметър:	2–5 mm
Дължина:	100–250 mm (в зависимост от размера на частиците на пълнежа), например 250 mm, ако диаметърът на частиците е 5 μ m.
Неподвижна фаза:	функционални групи алкиламини, свързани със силициев диоксид, максимален размер на частиците 5 μ m.

- 5.1.7. Условия на хроматография (пример):

Разтворител за елуиране (4.8.), скорост на потока: 1 ml/min

Откриване: диференцирана рефрактометрия

За да бъде сигурно, че детекторът е съвсем стабилен, той следва да бъде включен няколко часа преди използването му. Референтната клетка трябва да се напълни с разтворителя за елуиране.

- 5.2. Аналитична везна с точност до 0,1 mg.
- 5.3. Микромембранна апаратура за филтриране на малки количества (0,45 μ m)

6. Съхранение на пробите

След получаването им пробите се съхраняват на стайна температура до анализа.

7. Процедура

- 7.1. ЧАСТ А: Подготовка на пробата

7.1.1. Пробата се разклаща.

7.1.2. Пробата се филтрува с филтър с максимален размер на порите 0,45 μ m (5.3).

- 7.2. ЧАСТ Б: HPLC

7.2.1. Определяне

Инжектират се 10 μ l от стандартните разтвори (4.12.) и пробите (7.1.2.). Анализът се извършва при подходящи условия на хроматография, например по-горе описаните.

- 7.2.2. Ако пикът на дадена проба е с по-голяма площ (или височина) от съответния пик на най-концентрирания стандартен разтвор, пробата се разрежда с дестилирана вода и се анализира отново.

8. Изчисляване

Сравняват се хроматограмите на стандартния разтвор и спиртната напитка. Пиковите се определят по техните времена на задържане. Измерват се техните площи (или височини), за да се изчислят концентрациите по метода на външния стандарт. Вземат се предвид евентуални разреждания на пробата.

Крайният резултат е сумата на захароза, малтоза, лактоза, глюкоза и фруктоза, изразена като инвертна захар в g/l.

Инвертната захар се изчислява като сумата на всички монозахариди и присъстващите редуциращи дизахариди плюс стехиометричното количество глюкоза и фруктоза, изчислено въз основа на присъстващата захароза.

$$\text{Инвертна захар (g/l)} = \text{глюкоза (g/l)} + \text{фруктоза (g/l)} + \text{малтоза (g/l)} + \text{лактоза (g/l)} + (\text{захароза (g/l)} \times 1,05)$$

$$1,05 = \frac{(\text{молекулното тегло на фруктозата} + \text{молекулното тегло на глюкозата})}{\text{молекулното тегло на захарозата}}$$

9. Характеристики на ефективност на метода (прецизност)

9.1. Статистически резултати от междулабораторното изпитване

Следните данни бяха получени в резултат на международно проучване на ефективността на метода, извършено в съответствие с международно приети процедури ⁽¹⁾ ⁽²⁾.

Година на междулабораторното изпитване 2000 г.

Брой на лабораториите 24

Брой проби 8

⁽¹⁾ „Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies“, Horwitz, W. (1995 г.) Pure and Applied Chemistry 67, стр. 332-343.

⁽²⁾ Horwitz, W. (1982 г.) Analytical Chemistry 54, стр. 67A-76A.

Таблица 1

Фруктоза, глюкоза, малтоза

Аналит	Фруктоза		Глюкоза			Малтоза	
	Crème de Cassis	Стандарт (50 g/l)	Анасонова спиртна напитка	Crème de Cassis	Стандарт (50 g/l)	Анасонова спиртна напитка	Стандарт (10 g/l)
Средна стойност [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Брой лаборатории без отклоняващи се стойности	21	22	21	23	19	21	22
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Аналит	Фруктоза		Глюкоза			Малтоза	
	Crème de Cassis	Стандарт (50 g/l)	Анасонова спиртна напитка	Crème de Cassis	Стандарт (50 g/l)	Анасонова спиртна напитка	Стандарт (10 g/l)
Относително стандартно отклонение при повтаряемост RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Граница на повтаряемост r [g/l] ($r = 2,8 \times sr$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Граница на възпроизводимост, R [g/l] ($R = 2,8 \times sR$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Таблица 2

Захароза

Аналит	Захароза					
	Пастис	Узо	Черешов ликьор	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Стандарт (100 g/l)
Средна стойност [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Брой лаборатории без отклоняващи се стойности	19	19	20	18	18	18
Стандартно отклонение при повтаряемост s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Относително стандартно отклонение при повтаряемост RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Граница на повтаряемост r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) Проби с приблизително еднакво количество аналит

Таблица 3

Общи захари

(Бележка: Настоящите данни са изчислени за общи захари, а не за инвертна захар съгласно определението в раздел 8 по-горе.)

Проби	Пастис	Узо	Анасонова спиртна напитка	Черешов ликьор	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Стандарт (220 g/l)
Средна стойност [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Брой лаборатории без отклоняващи се стойности	20	19	20	20	18	18	19
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Граница на повторяемост r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) Проби с приблизително еднакво количество анализ

4) Добавя се следната глава X:

„X. **ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЛЕДНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ, ОТДЕЛЯЩИ СЕ ОТ ДЪРВЕСИНАТА, В СПИРТНИТЕ НАПИТКИ ЧРЕЗ ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (HPLC): ФУРФУРОЛ, 5-ХИДРОКСИМЕТИЛФУРФУРОЛ, 5-МЕТИЛФУРФУРОЛ, ВАНИЛИН, СИРИНГАЛДЕХИД, КОНИФЕРИЛ АЛДЕХИД, СИНАПАЛДЕХИД, ГАЛОВА КИСЕЛИНА, ЕЛАГИНОВА КИСЕЛИНА, ВАНИЛИНОВА КИСЕЛИНА, СИРИНГОВА КИСЕЛИНА И СКОПОЛЕТИН**

1. **Обхват**

Методът служи за определяне на фурфурол, 5-хидроксиметилфурфурол, 5-метилфурфурол, ванилин, сириналдехид, кониферил алдехид, синалдехид, галова киселина, елагинова киселина, ванилинова киселина, сириналдехид и скополетин чрез високоефективна течна хроматография.

2. **Нормативна референция**

Аналитичен метод, признат от Общото събрание на Международната организация по лозарство и винарство (OIV) и публикуван от OIV под референтен номер OIV-MA-BS-16: R 2009.

3. **Принцип**

Определяне чрез високоефективна течна хроматография (HPLC), с откриване чрез ултравиолетова спектрофотометрия при различни дължини на вълните и чрез спектрофлуорометрия.

4. Реактиви

Реактивите трябва да са с аналитична чистота. Използваната вода трябва да е дестилирана или да е с еквивалентна степен на чистота. За предпочитане е да се използва микро-филтрирана вода със съпротивление 18,2 M Ω .cm.

- 4.1. 96 об. % алкохол
- 4.2. Метанол с качество за HPLC (разтворител Б)
- 4.3. Оцетна киселина, разредена до 0,5 об % (разтворител А)
- 4.4. Мобилни фази: (само като пример)

Разтворител А (0,5 % оцетна киселина) и разтворител Б (чист метанол) се филтрират през мембрана (порьозност 0,45 μ m). При необходимост се дегазират в ултразвукова вана.

- 4.5. Референтни стандарти с минимална чистота 99 %: фурфурол, 5-хидроксиметилфурфурол, 5-метилфурфурол, ванилин, сирингалдехид, кониферил алдехид, синапалдехид, галова киселина, елагинова киселина, ванилинова киселина, сирингова киселина и скополетин
- 4.6. Референтен разтвор: Стандартните вещества се разтварят в 50 об. % воден разтвор на алкохол. Крайните концентрации в референтния разтвор следва да бъдат от порядъка на:

фурфурол: 5 mg/l; 5-хидроксиметилфурфурол: 10 mg/l; 5-метилфурфурол: 2 mg/l; ванилин: 5 mg/l; сирингалдехид: 10 mg/l; кониферил алдехид: 5 mg/l; синапалдехид: 5 mg/l; галова киселина: 10 mg/l; елагинова киселина: 10 mg/l; ванилинова киселина: 5 mg/l; сирингова киселина: 5 mg/l; скополетин: 0,5 mg/l.

5. Апаратура

Стандартно лабораторно оборудване

- 5.1. Високоэффективен течен хроматограф, който може да функционира в бинарно градиентен режим и е оборудван със:
 - 5.1.1. спектрофотометричен детектор, с който може да се извършват измервания при дължини на вълните от 260 до 340 nm. За предпочитане е обаче да се използва детектор за множество дължини на вълните, например с диодна матрица, за да се потвърди чистотата на пиковите;
 - 5.1.2. спектрофлуориметричен детектор — дължина на вълната за възбуждане: 354 nm, дължина на вълната за емитиране: 446 nm (за определяне на следи от скополетин; който обаче може да се открива и чрез спектрофотометрия при 313 nm);
 - 5.1.3. устройство за инжектиране, с което може да се въведат проби за изпитване от 10 или 20 μ l (например);
 - 5.1.4. колона за високоэффективна течна хроматография от тип RP C18, максимален размер на частиците 5 μ m.
- 5.2. Спринцовки за HPLC.
- 5.3. Устройство за мембранна филтрация на малки количества.
- 5.4. Изчислителен интегратор или записващо устройство, чиято ефективност на работа е съвместима с цялата апаратура, и по-специално трябва да има няколко канала за получаване на данни.

6. Процедура

- 6.1. Подготовка на разтвора за инжектиране

Референтният разтвор и спиртната напитка се филтрират при необходимост през мембрана с максимален диаметър на порите 0,45 μ m.

- 6.2. Условия за хроматографията: Анализът се извършва при температура на околната среда и с помощта на оборудването, описано в 5.1, а подвижните фази (4.4) се използват с дебит от около 0,6 ml в минута съгласно следния градиент (само като пример):

Време: 0 минути 50 минути 70 минути 90 минути

Разтворител А (вода-киселина): 100 % 60 % 100 % 100 %

Разтворител Б (метанол): 0 % 40 % 0 % 0 %

Следва да се отбележи, че в някои случаи този градиент следва да бъде променен, за да се избегне коелуиране.

- 6.3. Определяне

- 6.3.1. Референтните стандарти се инжектират поотделно, а след това смесени.

Работните условия се адаптират, така че разделителната способност на пиковете на всички съединения да е равна на поне 1.

- 6.3.2. Инжектира се подготвената съгласно 6.1 проба.

- 6.3.3. Измерва се площта на пиковете в референтния разтвор и спиртната напитка и се изчисляват концентрациите.

7. Изразяване на резултатите

Концентрацията на всяка съставка се изразява в mg/l.

8. Характеристики на ефективност на метода (прецизност)

Следните данни бяха получени през 2009 г. в резултат на международно проучване на ефективността на метода при различни спиртни напитки, извършено в съответствие с международно приети процедури ⁽¹⁾ ⁽²⁾.

8.1. Фурфурол

Аналит	Фурфурол					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	15	15	15	15	15	15
Брой приети резултати (лаборатории)	14	12	13	14	13	13
Средна стойност [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Аналит	Фурфурол					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Граница на повтаряемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	8	15	5	13	3	5
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-хидроксиметилфурфурол

Аналит	5-хидроксиметилфурфурол					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	16	16	16	16	16	16
Брой приети резултати (лаборатории)	14	14	14	14	14	14
Средна стойност [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Стандартно отклонение при повтаряемост s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Относително стандартно отклонение при повтаряемост RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Граница на повтаряемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-метилфурфуrol

Аналит	5-метилфурфуrol					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Проби						
Брой на участващите лаборатории	11	11	11	11	11	11
Брой приети резултати (лаборатории)	11	11	8	11	10	11
Средна стойност [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Ванилин

Аналит	Ванилин					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Проби						
Брой на участващите лаборатории	16	15	16	16	16	16
Брой приети резултати (лаборатории)	16	15	16	16	16	16
Средна стойност [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Аналит	Ванилин					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Сирингалдехид

Аналит	Сирингалдехид					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	16	15	16	16	16	16
Брой приети резултати (лаборатории)	13	13	13	12	14	13
Средна стойност [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Кониферил алдехид

Аналит	Кониферил алдехид					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	13	12	13	12	13	13
Брой приети резултати (лаборатории)	12	12	13	12	13	13
Средна стойност [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Синалалдехид

Аналит	Синалалдехид					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	14	14	14	14	15	14
Брой приети резултати (лаборатории)	14	13	12	13	13	12
Средна стойност [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Аналит	Синапалдехид					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Галова киселина

Аналит	Галова киселина					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Образец						
Брой на участващите лаборатории	16	15	16	16	16	16
Брой приети резултати (лаборатории)	15	14	16	16	16	16
Средна стойност [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Елагинова киселина

Аналит	Елагинова киселина					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	7	7	7	7	7	7
Брой приети резултати (лаборатории)	7	7	7	7	7	6
Средна стойност [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Ванилинова киселина

Аналит	Ванилинова киселина					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	15	15	15	15	15	15
Брой приети резултати (лаборатории)	12	11	14	14	15	14
Средна стойност [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Аналит	Ванилинова киселина					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Сирингова киселина

Аналит	Сирингова киселина					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	16	15	16	16	16	16
Брой приети резултати (лаборатории)	16	15	15	15	16	15
Средна стойност [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Скополетин

Аналит	Скополетин					
	Уиски	Бренди	Ром	Коняк 1	Уиски „Бърбън“	Коняк 2
Брой на участващите лаборатории	10	10	10	10	10	10
Брой приети резултати (лаборатории)	9	8	9	8	8	8
Средна стойност [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Стандартно отклонение при повторяемост s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Относително стандартно отклонение при повторяемост RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Граница на повторяемост r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Относително стандартно отклонение при възпроизводимост RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Граница на възпроизводимост R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06

(¹) „Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies“, Horwitz, W. (1995 г.) Pure and Applied Chemistry 67, стр. 332-343.

(²) Horwitz, W. (1982 г.) Analytical Chemistry 54, стр. 67A-76A.“