

II

(Nelegislativní akty)

NAŘÍZENÍ

PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2016/635

ze dne 22. dubna 2016,

kterým se mění příloha nařízení (ES) č. 2870/2000, pokud jde o některé referenční metody používané pro rozbor lihovin

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 ze dne 15. ledna 2008 o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 1576/89 ⁽¹⁾, a zejména na čl. 28 odst. 2 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Nařízení Komise (ES) č. 2870/2000 ⁽²⁾ uvádí seznam referenčních metod používaných pro rozbor lihovin a popisuje je. Některé metody uvedené v příloze uvedeného nařízení, mezi něž patří metody pro stanovení těkavých kyselin a celkového obsahu cukru v lihovinách, však ještě nebyly popsány.
- (2) Na metody pro stanovení těkavých kyselin a celkového obsahu cukru v některých lihovinách se zaměřily dvě mezinárodní validační studie, které byly provedeny v souladu s mezinárodně schválenými postupy, a výkonnostní parametry těchto metod byly shledány jako přijatelné. Studie byly uskutečněny jako součást výzkumného projektu Evropské komise začleněného do rámce IV Program norem, měření a pokusů (SMT). Popis uvedených metod by proto měl být zařazen do přílohy nařízení (ES) č. 2870/2000.
- (3) Nařízení (ES) č. 110/2008 stanoví požadavky pro některé kategorie lihovin, které mají stárnout v dřevěných nádobách, a stanoví, že jiné lihoviny mohou stárnutí prodělat. Rozbor hlavních sloučenin pocházejících ze dřeva může pomoci při posuzování, zda je vzorek v souladu s definicí odpovídající příslušné kategorii lihoviny. Mezinárodní organizace pro révu a víno (OIV) uznala metodu rozboru ke stanovení těchto sloučenin ve svém usnesení OIV/OENO 382 A/2009. Uznání této metody vycházelo z údajů získaných z mezinárodní studie výkonnosti metod u různých lihovin, která byla provedena na základě mezinárodně dohodnutých postupů. Tato metoda a její popis by proto měly být přidány k referenčním metodám Unie používaným pro rozbor lihovin uvedeným v příloze nařízení (ES) č. 2870/2000.
- (4) Nařízení (ES) č. 2870/2000 by proto mělo být odpovídajícím způsobem změněno.
- (5) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro lihoviny,

⁽¹⁾ Úř. věst. L 39, 13.2.2008, s. 16.⁽²⁾ Nařízení Komise (ES) č. 2870/2000 ze dne 19. prosince 2000, kterým se stanoví referenční metody Společenství používané pro rozbor lihovin (Úř. věst. L 333, 29.12.2000, s. 20).

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Příloha nařízení (ES) č. 2870/2000 se mění v souladu s přílohou tohoto nařízení.

Článek 2

Toto nařízení vstupuje v platnost třetím dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 22. dubna 2016.

Za Komisi
předseda
Jean-Claude JUNCKER

PŘÍLOHA

Příloha nařízení (ES) č. 2870/2000 se mění takto:

1) Obsah se mění takto:

a) v bodech III.3 a VIII se odstraňuje výraz „(p.m.)“;

b) doplňuje se nový bod, který zní:

„X. Stanovení složek dřeva: „furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanilin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, kyselina gallová, kyselina ellagová, kyselina vanilová, kyselina syringová a skopoletin“.“

2) V kapitole III se doplňuje nová část, která zní:

„III.3 STANOVENÍ TĚKAVÝCH KYSELIN V LIHOVINÁCH

1. **Oblast použití**

Tato metoda byla validována mezilaboratorní studií pro rum, brandy, matolinové a ovocné destiláty s obsahem od 30 mg/l do 641 mg/l.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987 Jakost vody pro analytické účely – Specifikace a zkušební metody

3. **Definice**

3.1. Obsah těkavých kyselin se vypočítá odečtením obsahu netěkavých kyselin od celkového obsahu kyselin.

3.2. Celkový obsah kyselin je součet titrovatelných kyselin.

3.3. Obsah netěkavých kyselin je tvořen zbytky po odpaření lihoviny do sucha.

4. **Podstata metody**

Celkový obsah kyselin a obsah netěkavých kyselin se určí titrací či potenciometrií.

5. **Reakční činidla a materiál**

Není-li uvedeno jinak, použijí se při rozboru pouze reakční činidla o čistotě p.a. a voda o čistotě alespoň 3 podle normy ISO 3696:1987.

5.1. 0,01 M roztoku chloridu sodného (NaOH)

5.2. Směsný indikátorový roztok:

Odváží se 0,1 g indigokarmínu a 0,1 g fenolové červení.

Rozpusť se ve 40 ml vody a doplní se ethanolem na 100 ml.

6. **Přístroje a vybavení**

Laboratorní vybavení na nepřímé měření, laboratorní sklo třídy A a následující vybavení:

6.1. Vodní vývěva

- 6.2. Rotační odpařovač nebo ultrazvuková lázeň
- 6.3. Vybavení na potenciometrickou titraci (nepovinné)

7. Odběr vzorků a vzorky

Před rozbořením se vzorky uchovávají při pokojové teplotě.

8. Postup

8.1. Celkový obsah kyselin

8.1.1. Příprava vzorku

V případě potřeby se lihovina ozáří ultrazvukovými vlnami (ultrasonikace) nebo se v případě potřeby míchá ve vakuu po dobu dvou minut, aby byla zbavena oxidu uhličitého.

8.1.2. Titrace

25 ml lihoviny se pipetou přenese do Erlenmeyerovy baňky o obsahu 500 ml.

Přidá se přibližně 200 ml zchlazené převařené destilované vody (čerstvě připravené každý den) a 2–6 kapek směsného indikátorového roztoku (5.2).

Titruje se s 0,01 M roztokem hydroxidu sodného (5.1), dokud se v případě bezbarvé lihoviny žlutozelená barva nezmění ve fialovou a v případě hnědě zbarvené lihoviny v červenohnědou.

Je rovněž možné provést potenciometrickou titraci do pH 7,5.

Nechť $n_{1\text{ ml}}$ je objem 0,01 M přidaného roztoku hydroxidu sodného.

8.1.3. Výpočet

Celkový obsah kyselin (CK) vyjádřený v miliekvivalentech na litr lihoviny je $0,4 \times n_1$.

Celkový obsah kyselin (CK') vyjádřený v miliekvivalentech na litr lihoviny je $24 \times n_1$

8.2. Obsah netěkavých kyselin

8.2.1. Příprava vzorku

Nechá se odpařit 25 ml lihoviny do sucha:

25 ml lihoviny se přenese pipetou do válcové odpařovací misky o průměru 55 mm s rovným dnem. Během první hodiny odpařování je odpařovací miska umístěna na poklopu lázně s vařící vodou, aby se kapalina nevařila, protože by při vystříknutí mohlo dojít k jejím ztrátám.

Vzorek se dosuší umístěním odpařovací misky do sušárny při 105 °C na dvě hodiny. Odpařovací miska se nechá zchladnout v exsikátoru.

8.2.2. Titrace

Zbytek po odpařování se rozpustí pomocí zchlazené převařené destilované vody (čerstvě připravené každý den), doplňuje se až do objemu přibližně 100 ml a přidá se 2–6 kapek směsného indikátorového roztoku (5.2).

Titruje se s 0,01 M roztokem hydroxidu sodného (5.1).

Je rovněž možné provést potenciometrickou titraci do pH 7,5.

Nechť $n_{2\text{ ml}}$ je objem 0,01 M přidaného roztoku hydroxidu sodného.

8.2.3. Výpočet

Obsah netěkavých kyselin (NK) vyjádřený v miliekvivalentech na litr lihoviny je $0,4 \times n_2$.

Obsah netěkavých kyselin (NK) vyjádřený v mg kyseliny octové na litr lihoviny je $24 \times n_2$.

9. Výpočet obsahu těkavých kyselin

9.1. Vyjádřeno v miliekvivalentech na litr:

Nechť:

CK = celkový obsah kyselin v miliekvivalentech na litr

NK = obsah netěkavých kyselin v miliekvivalentech na litr

Obsah těkavých kyselin, TK, v miliekvivalentech na litr je:

$$CK - NK$$

9.2. Vyjádřeno v mg kyseliny octové na litr:

Nechť:

CK' = celkový obsah kyselin v mg kyseliny octové na litr

NK' = obsah netěkavých kyselin v mg kyseliny octové na litr

Obsah těkavých kyselin, TK, v mg kyseliny octové na litr je:

$$CK' - NK'$$

9.3. Vyjádřeno v g kyseliny octové na hl čistého alkoholu o 100 % objemových je: $\frac{CK' - NK'}{A} \times 10$

kde A je objemový obsah alkoholu v lihovině

10. Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)

10.1. Statistické výsledky mezilaboratorního testu

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1] [2].

Rok provedení mezilaboratorního testu **2000**

Počet laboratoří 18

Počet vzorků 6

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet zahrnutých laboratoří po vyloučení odlehklých výsledků	16	18	18	14	18	18
Počet odlehklých výsledků (laboratoří)	2			4		
Počet zahrnutých výsledků	32	36	36	28	36	36
Střední hodnota ($\bar{x}$) [mg/L]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti, s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Relativní směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti, RSD _r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Mez opakovatelnosti, r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD _R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Mez reprodukovatelnosti, R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Typy vzorků

A Švestkový destilát: rozdělená úroveň (*).

B Rum I: neoznačené duplikáty.

C Rum II: rozdělená úroveň (*).

D Slivovice: neoznačené duplikáty.

E Brandy: neoznačené duplikáty.

F Matolinová pálenka: neoznačené duplikáty.

[1] Horwitz, W., „Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies“, *Pure and Applied Chemistry* 67, 1995, s. 332–343.

[2] Horwitz, W., „Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs“, *Analytical Chemistry* 54, 1982, s. 67 A–76 A.“

3) Doplnuje se kapitola VIII, která zní:

„VIII. CELKOVÝ OBSAH CUKRU

1. Oblast použití

Ke stanovení celkového obsahu cukru (vyjádřeného jako invertní cukr) v lihovinách, s výjimkou lihovin obsahujících vaječné či mléčné produkty, je použitelná metoda HPLC–RI.

Tato metoda byla validována mezilaboratorní studií pro pastis, destilovaný anis, třešňový likér, crème de (s uvedením názvu ovoce nebo použité suroviny) a crème de cassis v množstvích od 10,86 g/l do 509,7 g/l. Linearita odezvy přístroje však byla prokázána pro rozsah koncentrace od 2,5 g/l do 20,0 g/l.

Tato metoda není určena pro stanovení nízkých hodnot obsahu cukru.

2. Odkazy na normy

ISO 3696:1987 Jakost vody pro analytické účely – Specifikace a zkušební metody

3. Podstata metody

K určení koncentrace glukózy, fruktózy, sacharózy, maltózy a laktózy v cukerných roztocích se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Tato metoda využívá alkylaminovou stacionární fázi a diferenční refraktometrickou detekci a slouží jako příklad. Jako stacionární fázi je možné použít také aniontoměničové pryskyřice.

4. Reakční činidla a materiál

- 4.1. Glukóza (CAS 50-99-7), o čistotě alespoň 99 %.
- 4.2. Fruktóza (CAS 57-48-7), o čistotě alespoň 99 %.
- 4.3. Sacharóza (CAS 57-50-1), o čistotě alespoň 99 %.
- 4.4. Laktóza (CAS 5965-66-2), o čistotě alespoň 99 %.
- 4.5. Monohydrát maltózy (CAS 6363-53-7), o čistotě alespoň 99 %.
- 4.6. Čistý acetonitril (CAS 75-05-8) na rozbor pomocí HPLC.
- 4.7. Destilovaná nebo demineralizovaná voda, nejlépe mikrofiltrovaná.

4.8. Rozpouštědla (příklad)

Eluční rozpouštědlo se skládá z:

75 objemových částí acetonitrilu (4.6)

25 objemových částí destilované vody (4.7)

Před použitím se nechá roztokem po dobu 5–10 minut pomalu procházet helium, aby došlo k odplynění.

Pokud se nepoužívá mikrofiltrovaná voda, je třeba rozpouštědlo přefiltrovat pomocí filtru pro organická rozpouštědla s maximální velikostí pórů 0,45 µm.

- 4.9. Absolutní ethanol (CAS 64-17-5).
- 4.10. Roztok ethanolu (5 % obj.).
- 4.11. Příprava standardního zásobního roztoku (20 g/l)

Odváží se 2 g každého cukru, který má být analyzován (4.1–4.5), a vzorky se beze ztrát přenesou do odměrné baňky o objemu 100 ml. (Poznámka: 2 g maltózy odpovídá 2,11 g monohydrátu maltózy).

Doplní se roztokem alkoholu o 5 % obj. (4.10) do 100 ml, protřepe se a uchovává při teplotě přibližně + 4 °C. Každý týden se připraví nový zásobní roztok.

4.12. Příprava standardních pracovních roztoků (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 a 20,0 g/l)

Odpovídajícím způsobem se zředí zásobní roztok – 20 g/l (4.11) – roztokem alkoholu o 5 % obj. (4.10), aby se získalo pět standardních pracovních vzorků o hmotnostní koncentraci 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 a 20,0 g/l. Přefiltruje se pomocí filtru s maximální velikostí pórů 0,45 µm (5.3).

5. **Přístroje a vybavení**

5.1. Systém pro HPLC, který umožňuje separaci všech cukrů na základní linii.

5.1.1. Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s šesticestným vstřikovacím ventilem a 10 μ l smyčkou nebo jiným automatickým nebo manuálním zařízením, které umožňuje spolehlivé dávkování velmi malých objemů.

5.1.2. Čerpací systém umožňující s velkou přesností dosáhnout stálého či programovaného průtoku a udržet jej.

5.1.3. Diferenciální refraktometr.

5.1.4. Integrátor či zapisovač, jehož výkon je kompatibilní s ostatním vybavením.

5.1.5. Předkolona:

Doporučuje se k analytické koloně připojit vhodnou předkolonu.

5.1.6. Kolona (příklad):

Materiál: nerezavějící ocel nebo sklo.

Vnitřní průměr: 2–5 mm.

Délka: 100–250 mm (v závislosti na velikosti částic plnicího materiálu), například pokud je průměr částic 5 μ m, odpovídající délka je 250 mm.

Stacionární fáze: alkylaminové funkční skupiny vázané na oxid křemičitý s maximální velikostí částic 5 μ m.

5.1.7. Podmínky chromatografie (příklad):

Eluční rozpouštědlo (4.8.), průtok: 1 ml/minuta.

Detekce: Diferenční refraktometrie.

Aby byla zajištěna dokonalá stabilita detektoru, měl by být zapnutý po dobu několika hodin před použitím. Referenční část musí být naplněna elučním rozpouštědlem.

5.2. Analytické váhy s přesností 0,1 mg.

5.3. Filtr na malé objemy s mikromembránou 0,45 μ m.

6. **Uchovávání vzorků**

Okamžitě po obdržení se vzorky umísťují do prostředí s pokojovou teplotou, kde jsou před rozбором uchovávány.

7. **Postup**

7.1. ČÁST A: Příprava vzorku

7.1.1. Vzorek se protřepe.

7.1.2. Přefiltruje se pomocí filtru s maximální velikostí pórů 0,45 μ m (5.3).

7.2. ČÁST B: HPLC

7.2.1. Stanovení

Vstříkne se 10 μ l standardních roztoků (4.12.) a vzorků (7.1.2.). Za vhodných podmínek pro chromatografii, například výše popsanych, se provede rozbor.

- 7.2.2. Pokud je plocha (nebo výška) některého píku vzorku větší než u nejkonzentrovanějšího standardu, příslušný vzorek je třeba zředit destilovanou vodou a zanalyzovat znovu.

8. Výpočet

Srovnají se chromatogramy získané z rozboru standardního roztoku a z rozboru lihoviny. Podle retenčních časů se určí píky. Změří se plochy (či výšky) píků a metodou vnějšího standardu se vypočítají koncentrace. Zohlední se naředění vzorku.

Výsledkem je součet obsahu sacharózy, maltózy, laktózy, glukózy a fruktózy vyjádřený jako invertní cukr v g/l.

Invertní cukr se vypočítá jako součet všech přítomných monosacharidů a redukujících disacharidů plus stechiometrické množství glukózy a fruktózy vypočítané z přítomné sacharózy.

Invertní cukr (g/l) = glukóza (g/l) + fruktóza (g/l) + maltóza (g/l) + laktóza (g/l) + (sacharóza (g/l) × 1,05)

1,05 = (molekulární hmotnost fruktózy + molekulární hmotnost glukózy)/molekulární hmotnost sacharózy

9. Účinnostní charakteristiky metody (přesnost)

9.1. Statistické výsledky mezilaboratorního testu

Následující údaje byly získány při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody prováděném mezinárodně dohodnutým postupem [1] [2].

Rok provedení mezilaboratorního testu 2000

Počet laboratoří 24

Počet vzorků 8

[1] Horwitz, W., „Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies“, *Pure and Applied Chemistry* 67, 1995, s. 332–343.

[2] Horwitz, W., „Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs“, *Analytical Chemistry* 54, 1982, s. 67 A–76 A.

Tabulka 1

Fruktóza, glukóza, maltóza

Analyt	Fruktóza		Glukóza			Maltóza	
	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Anýzové lihoviny	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Anýzové lihoviny	Standard (10 g/l)
Vzorky (× 2)							
Střední hodnota [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Počet laboratoří bez odlehých výsledků	21	22	21	23	19	21	22
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s _r [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analyt	Fructóza		Glukóza			Maltóza	
Vzorky (× 2)	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Anýzové lihoviny	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Anýzové lihoviny	Standard (10 g/l)
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Mez opakovatelnosti, r [g/l] ($r = 2,8 \times sr$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabulka 2

Sacharóza

Analyt	Sacharóza					
Vzorky	Pastis	Ouzo	Třešňový likér	Crème de menthe	Crème de cassis	Standard (100 g/l)
Střední hodnota [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Počet laboratoří bez odlehlých výsledků	19	19	20	18	18	18
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Mez opakovatelnosti, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) rozdělení na úrovně

Tabulka 3

Celkový obsah cukru

(Poznámka: tyto údaje byly vypočítány pro celkový obsah cukru, ne pro invertní cukr definovaný výše v bodu 8.)

Vzorky	Pastis	Ouzo	Anýzové líhoviny	Třešňový likér	Crème de menthe	Crème de cassis	Standard (220 g/l)
Střední hodnota [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Počet laboratoří bez odlehlých výsledků	20	19	20	20	18	18	19
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_p [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Mez opakovatelnosti, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Mez reprodukovatelnosti R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) rozdělení na úrovně

4) Vkládá se nová kapitola X, která zní:

„X. STANOVENÍ NÁSLEDUJÍCÍCH SLOUČENIN ZE DŘEVA V LIHOVINÁCH POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE (HPLC): FURFURAL, 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL, 5-METHYLFURFURAL, VANILIN, SYRINGALDEHYD, KONIFERALDEHYD, SINAPALDEHYD, KYSELINA GALLOVÁ, KYSELINA ELAGOVÁ, KYSELINA VANILOVÁ, KYSELINA SYRINGOVÁ A SKOPOLETIN

1. **Oblast použití**

Tato metoda umožňuje pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovit furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanilin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, kyselinu gallovou, kyselinu ellagovou, kyselinu vanilovou, kyselinu syringovou a skopoletin.

2. **Odkazy na normy**

Analytická metoda uznaná valným shromážděním Mezinárodní organizace pro révu a víno (OIV) a zveřejněná touto organizací pod číslem OIV-MA-BS-16: R2009.

3. **Podstata metody**

Stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a detekce ultrafialovou spektrofotometrií na několika vlnových délkách a spektrofotometrií.

4. Reakční činidla

Reakční činidla musí mít analytickou jakost. Je třeba použít destilovanou vodu nebo vodu přinejmenším srovnatelné čistoty. Doporučuje se použít mikrofiltrovanou vodu s měrným odporem 18,2 MΩ.cm.

- 4.1. Roztok alkoholu o 96 % obj.
- 4.2. Methanol jakosti vhodné pro metodu HPLC (rozpouštědlo B).
- 4.3. Kyselina octová o koncentraci 0,5 % obj. (Rozpouštědlo A).
- 4.4. Mobilní fáze: (pouze jako příklad).

Rozpouštědlo A (0,5 % kyselina octová) a rozpouštědlo B (čistý methanol). Přefiltrujte přes membránu (porozita 0,45 µm). Pokud nutno, odplyňte v ultrazvukové lázni.

- 4.5. Referenční standardy o minimálně o 99 % čistotě: furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanilin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, kyselina gallová, kyselina ellagová, kyselina vanilová, kyselina syringová a skopoletin.
- 4.6. Referenční roztok: standardní látky jsou rozpuštěny v 50 % obj. roztoku alkoholu a vody. Výsledné koncentrace v referenčním roztoku by měly být řádově:

furfural: 5 mg/l; 5-hydroxymethyl furfural: 10 mg/l; 5-methylfurfural 2 mg/l; vanilin: 5 mg/l; syringaldehyd: 10 mg/l; koniferaldehyd: 5 mg/l; sinapaldehyd: 5 mg/l; kyselina gallová: 10 mg/l; kyselina ellagová: 10 mg/l; kyselina vanilová: 5 mg/l; kyselina syringová: 5 mg/l; skopoletin: 0,5 mg/l.

5. Přístroje a pomůcky

Běžné laboratorní vybavení

- 5.1. Vysoce účinný kapalinový chromatograf podporující binární gradient, který obsahuje:
 - 5.1.1. Spektrofotometrický detektor schopný měřit ve vlnových délkách 260–340 nm. Je však vhodnější použít detektor s diodovým polem schopný měřit ve více vlnových délkách nebo podobný detektor, aby bylo možné potvrdit čistotu píků.
 - 5.1.2. Spektrofluorimetrický detektor – excitační vlnová délka: 354 nm, emisní vlnová délka: 446 nm (pro stanovení skopoletinu – lze ho rovněž detekovat spektrofotometrií na vlnové délce 313 nm).
 - 5.1.3. Dávkovací zařízení schopné vstříknout (například) 10 či 20 µl testovaného vzorku.
 - 5.1.4. Kolona pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, typ RP C18, maximální velikost částic 5 µm.
- 5.2. Stříkačky na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).
- 5.3. Zařízení na membránovou filtraci malých objemů.
- 5.4. Integrátor či zapisovač, jehož výkon je kompatibilní s celou aparaturou; především musí mít několik přijímacích kanálů.

6. Postup

- 6.1. Příprava dávkovacího roztoku.

V případě potřeby jsou referenční roztok a lihovina přefiltrovány přes membránu s póry o průměru nejvýše 0,45 µm.

- 6.2. Podmínky pro provedení chromatografie: provede se rozbor při teplotě okolního prostředí pomocí vybavení popsaného v bodě 5.1 a za použití mobilních fází (4.4) s průtokem přibližně 0,6 ml za minutu podle níže uvedeného gradientu (pouze jako příklad).

Čas: 0 min. 50 min. 70 min. 90 min.

rozpouštědlo A (voda–kyselina): 100 % 60 % 100 % 100 %

rozpouštědlo B (methanol) 0 % 40 % 0 % 0 %

Je třeba mít na paměti, že v některých případech je třeba gradient upravit, aby nedošlo ke koeluci.

6.3. Stanovení

- 6.3.1. Referenční standardy se vstříknou odděleně, poté smíchané.

Provozní podmínky se upraví tak, aby separační faktor píků všech sloučenin byl přinejmenším 1.

- 6.3.2. Vzorek připravený v bodě 6.1 se vstříkne do aparatury.

- 6.3.3. Změří se plocha píků pro referenční roztoky a lihoviny a vypočítají se koncentrace.

7. Vyjádření výsledků

Koncentrace každé složky se vyjádří v mg/l.

8. Pracovní charakteristiky metody (přesnost)

Následující údaje byly získány v roce 2009 při mezinárodním mezilaboratorním experimentu zaměřeném na parametry metody, který zkoumal množství lihovin a byl prováděn mezinárodně dohodnutým postupem [1] [2].

8.1. Furfural:

Analyt	Furfural:					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	15	15	15	15	15	15
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	14	12	13	14	13	13
Střední hodnota [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analyt	Furfural:					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	8	15	5	13	3	5
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-hydroxymethylfurfural

Analyt	5-hydroxymethylfurfural					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	16	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	14	14	14	14	14	14
Střední hodnota [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-methylfurfural

Analyt	5-methylfurfural					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	11	11	11	11	11	11
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	11	11	8	11	10	11
Střední hodnota [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanilin

Analyt	Vanilin					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	15	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	16	15	16	16	16	16
Střední hodnota [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analyt	Vanilin					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Syringaldehyd

Analyt	Syringaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	15	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	13	13	13	12	14	13
Střední hodnota [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Koniferaldehyd

Analyt	Koniferaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	13	12	13	12	13	13
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	12	12	13	12	13	13
Střední hodnota [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinapaldehyd

Analyt	Sinapaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	14	14	14	14	15	14
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	14	13	12	13	13	12
Střední hodnota [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analyt	Sinapaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Kyselina gallová

Analyt	Kyselina gallová					
Vzorek	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	15	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	15	14	16	16	16	16
Střední hodnota [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Kyselina ellagová

Analyt	Kyselina ellagová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	7	7	7	7	7	7
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	7	7	7	7	7	6
Střední hodnota [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Kyselina vanilová

Analyt	Kyselina vanilová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	15	15	15	15	15	15
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	12	11	14	14	15	14
Střední hodnota [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analyt	Kyselina vanilová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Kyselina syringová

Analyt	Kyselina syringová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	16	15	16	16	16	16
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	16	15	15	15	16	15
Střední hodnota [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Mez reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Skopoletin

Analyt	Skopoletin					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastněných laboratoří	10	10	10	10	10	10
Počet zahrnutých výsledků (laboratoří)	9	8	9	8	8	8
Střední hodnota [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Mez opakovatelnosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Mezní reprodukovatelnosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06

[1] Horwitz, W., „Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies“, *Pure and Applied Chemistry* 67, 1995, s. 332–343.

[2] Horwitz, W., „Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs“, *Analytical Chemistry* 54, 1982, s. 67 A–76 A.“