

II.

(Nezakonodavni akti)

UREDBE

PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2016/635

od 22. travnja 2016.

**o izmjeni Priloga Uredbi (EZ) br. 2870/2000 u pogledu određenih referentnih metoda za analizu
jakih alkoholnih pića**

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EZ) br. 110/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 15. siječnja 2008. o definiciji, opisivanju, prezentiranju, označavanju i zaštiti zemljopisnih oznaka jakih alkoholnih pića i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 1576/89 ⁽¹⁾, a posebno njezin članak 28. stavak 2.,

budući da:

- (1) U Uredbi Komisije (EZ) br. 2870/2000 ⁽²⁾ popisuju se i opisuju referentne metode za analizu jakih alkoholnih pića. Međutim, određene metode navedene u Prilogu toj Uredbi, među ostalima metode za određivanje hlapive kiselosti i ukupnih šećera u jakim alkoholnim pićima, još nisu opisane.
- (2) Metode za određivanje hlapive kiselosti i ukupnih šećera u određenim jakim alkoholnim pićima bile su predmetom dvjema međunarodnim validacijskim studijama koje su provedene u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima te su njihovi parametri metode ocijenjeni prihvatljivima. Studije su provedene u okviru istraživačkog projekta koji je bio sastavni dio četvrtog okvirnog programa Europske komisije (EK) za norme, mjerenja i ispitivanja (SMT). Stoga bi opis tih metoda trebalo uvrstiti u Prilog Uredbi (EZ) br. 2870/2000.
- (3) Uredbom (EZ) br. 110/2008 utvrđuju se zahtjevi u pogledu određenih kategorija jakih alkoholnih pića koja moraju dozrijevati u drvenim posudama te se predviđa da i druga pića mogu biti podvrgnuta takvom postupku dozrijevanja. Analiza glavnih spojeva koji proizlaze iz drveta može biti korisna pri provjeri usklađenosti uzorka s definicijom koja odgovara relevantnoj kategoriji jakog alkoholnog pića. Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (OIV) u svojoj je odluci OIV/OENO 382A/2009 priznala metodu za analizu namijenjenu određivanju tih spojeva. Priznanje te metode utemeljeno je na podacima dobivenima iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode provedenog na različitim jakim alkoholnim pićima u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima. Tu metodu i njezin opis stoga bi trebalo dodati u referentne metode Unije za analizu jakih alkoholnih pića utvrđene u Prilogu Uredbi (EZ) br. 2870/2000.
- (4) Uredbu (EZ) br. 2870/2000 trebalo bi stoga na odgovarajući način izmijeniti.
- (5) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Odbora za jaka alkoholna pića,

⁽¹⁾ SL L 39, 13.2.2008., str. 16.

⁽²⁾ Uredba Komisije (EZ) br. 2870/2000 od 19. prosinca 2000. o utvrđivanju referentnih metoda Zajednice za analizu jakih alkoholnih pića (SL L 333, 29.12.2000., str. 20.).

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Prilog Uredbi (EZ) br. 2870/2000 mijenja se u skladu s Prilogom ovoj Uredbi.

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu trećeg dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 22. travnja 2016.

Za Komisiju
Predsjednik
Jean-Claude JUNKER

PRILOG

Prilog Uredbi (EZ) br. 2870/2000 mijenja se kako slijedi:

1. Sadržaj se mijenja kako slijedi:

(a) u točkama III.3. i VIII. briše se pojam „(p.m.)”;

(b) dodaje se sljedeća točka:

„X. Određivanje spojeva iz drveta: furfural, 5-hidroksimetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilin, siringaldehid, koniferaldehid, sinapaldehid, galna kiselina, elagična kiselina, vanilinska kiselina, siringična kiselina i skopoletin.”

2. U poglavlju III. dodaje se sljedeći dio:

„III.3. ODREĐIVANJE HLAPIVE KISELOSTI JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA

1. **Područje primjene**

Metoda je validirana u međulaboratorijskom ispitivanju za rum, brandy, rakiju od komine i rakiju od voća na razinama u rasponu od 30 mg/l do 641 mg/l.

2. **Referentni standardi**

ISO 3696: 1987 Voda za analitičku uporabu – Specifikacija i metode ispitivanja.

3. **Definicije**

3.1. Hlapiva kiselost izračunava se oduzimanjem fiksne kiselosti od ukupne kiselosti.

3.2. Ukupna kiselost jest zbroj titracijskih kiselosti.

3.3. Fiksna kiselost jest kiselost rezidua preostalog nakon isparavanja jakog alkoholnog pića do suhoće.

4. **Načelo**

Ukupna kiselost i fiksna kiselost utvrđuju se titracijom ili potencijometrijskom titracijom.

5. **Reagensi i materijali**

Tijekom analize, osim ako nije drukčije navedeno, upotrebljavaju se samo reagensi priznate analitičke kvalitete i stupnja kvalitete vode od najmanje 3, kako je definirano u normi ISO 3696:1987.

5.1. 0,01 M otopina natrijeva hidroksida (NaOH)

5.2. Otopina miješanog indikatora:

Odvagne se 0,1 g bojila indigo carmine i 0,1 g fenol crvene.

Rastopi ih se u 40 ml vode i do 100 ml napuni etanolom.

6. **Uređaji i oprema**

Neizravna laboratorijska oprema, stakleni pribor A razreda i sljedeće:

6.1. Pumpa za vodu

- 6.2. Rotirajući isparivač ili ultrazvučna kupelj
- 6.3. Oprema za potenciometriarsku titraciju (neobvezno)

7. Uzorkovanje i uzorci

Uzorci se skladište na sobnoj temperaturi prije analize.

8. Postupak

8.1. Ukupna kiselost

8.1.1. Priprema uzorka

Jako alkoholno piće ozračuje se ultrazvukom ili miješanjem dvije minute u vakuumu kako bi se iz njega uklonio ugljikov dioksid ako je to potrebno.

8.1.2. Titracija

U Erlenmeyerovu tikvicu od 500 ml pipetira se 25 ml jakog alkoholnog pića.

Doda se oko 200 ml ohlađene prokuhane destilirane vode (svakodnevno svježe pripremljene) i dvije do šest kapi otopine miješanog indikatora (5.2.).

Titrira se s 0,01 M otopine natrijeva hidroksida (5.1.) sve dok se boja ne promijeni iz žutozelene u ljubičastu kod bezbojnih jakih alkoholnih pića, odnosno iz žutosmeđe u crvenosmeđu u slučaju jakih alkoholnih pića smeđe boje.

Titracija može biti i potenciometriarska, do pH od 7,5.

Volumen 0,01 M dodane otopine natrijevog hidroksida označiti s n_1 ml.

8.1.3. Izračun

Ukupna kiselost (engl. *total acidity*, TA) izražena u miliekvivalentima po litri jakog alkoholnog pića odgovara $0,4 \times n_1$.

Ukupna kiselost (TA) izražena u miligramima octene kiseline po litri jakog alkoholnog pića odgovara $24 \times n_1$.

8.2. Fiksna kiselost

8.2.1. Priprema uzorka

Ispariti 25 ml jakog alkoholnog pića do suhoće.

Pipetirati 25 ml jakog alkoholnog pića u cilindričnoj posudi za isparavanje s ravnim dnom promjera 55 mm. Tijekom prvog sata isparavanja, posuda za isparavanje stavi se na poklopac kipuće vodene kupelji tako da tekućina neće vreti jer bi to moglo dovesti do gubitka zbog prskanja.

Sušenje se završi stavljanjem posude za isparavanje na dva sata u sušionik na 105 °C. Posudu za isparavanje ostaviti da se ohladi u sušioniku.

8.2.2. Titracija

Otopiti rezidue preostale nakon isparavanja ohlađenom prokuhanom destiliranom vodom (svakodnevno svježe pripremljenom) i dopuniti do približno 100 ml te dodati dvije do šest kapi otopine miješanog indikatora (5.2.).

Titrirati s 0,01 M otopine natrijeva hidroksida (5.1.).

Titracija može biti i potencijometrijska, do pH od 7,5.

Volumen 0,01 M dodane otopine natrijevog hidroksida označiti s n_2 ml.

8.2.3. Izračun

Fiksna kiselost (engl. *fixed acidity*, FA) izražena u miliekvivalentima po litri jakog alkoholnog pića odgovara $0,4 \times n_2$.

Fiksna kiselost (FA) izražena u miligramima octene kiseline po litri jakog alkoholnog pića odgovara $24 \times n_2$.

9. Izračun hlapive kiselosti

9.1. Izraženo u miliekvivalentima po litri:

Neka je:

TA = ukupna kiselost u miliekvivalentima po litri

FA = fiksna kiselost u miliekvivalentima po litri

Hlapiva kiselost, VA (engl. *volatile acidity*) u miliekvivalentima po litri odgovara:

$$TA - FA$$

9.2. Izraženo u miligramima octene kiseline po litri:

Neka je:

TA' = ukupna kiselost u miligramima octene kiseline po litri

FA' = fiksna kiselost u miligramima octene kiseline po litri

Hlapiva kiselost, VA u miligramima octene kiseline po litri odgovara:

$$TA' - FA'$$

9.3. Izraženo u gramima octene kiseline po hektolitr čistog stopostotnog alkohola odgovara: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

pri čemu je A alkoholna jakost po volumenu jakog alkoholnog pića.

10. Svojstva metode (preciznost)

10.1. Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Sljedeći podaci su dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima [1] [2].

Godina međulaboratorijskog ispitivanja **2000.**

Broj laboratorija 18

Broj uzoraka 6

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Broj laboratorija zadržan nakon odbacivanja ekstremnih vrijednosti	16	18	18	14	18	18
Broj ekstremnih vrijednosti (laboratorija)	2			4		
Broj prihvaćenih rezultata	32	36	36	28	36	36
Srednja vrijednost ($\bar{x}$) [mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Granica ponovljivosti, r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Granica obnovljivosti, R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Vrste uzoraka:

A brandy od šljiva; razina razdiobe*

B rum I.; dvostruke slijepe probe

C rum II.; razina razdiobe*

D šljivovica; dvostruke slijepe probe

E brandy; dvostruke slijepe probe

F rakija od komine; dvostruke slijepe probe

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

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

3. Umeće se sljedeće poglavlje VIII.:

„VIII. UKUPNI ŠEĆER

1. Područje primjene

Metoda HPLC-RI primjenjiva je za određivanje ukupnog šećera (izraženog kao invertni šećer) u jakim alkoholnim pićima, osim likera koji sadržavaju proizvode od jaja i mlijeka.

Metoda je validirana u međulaboratorijskom ispitivanju za pastis, destilirani anis, liker od trešanja, krem liker od (naziv upotrijebljenog voća ili sirovine) i crème de cassis, u razinama od 10,86 g/l do 509,7 g/l. Međutim, linearnost odziva instrumenta dokazana je za raspon koncentracije od 2,5 g/l do 20,0 g/l.

Ta metoda nije namijenjena određivanju niskih razina šećera.

2. Referentni standardi

ISO 3696:1987 Voda za analitičku uporabu – Specifikacija i metode ispitivanja.

3. Načelo

Analiza otopina šećera visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom radi određivanja koncentracija glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze i laktoze u njima.

U toj se metodi upotrebljava stacionarna faza alkil amina i određivanje diferencijalnom refraktometrijom i navodi se kao primjer. Moguća bi bila i upotreba smole za anionsku izmjenu kao stacionarne faze.

4. Reagensi i materijali

- 4.1. Glukoza (CAS 50-99-7), čistoće od najmanje 99 %.
- 4.2. Fruktoza (CAS 57-48-7), čistoće od najmanje 99 %.
- 4.3. Saharoza (CAS 57-50-1), čistoće od najmanje 99 %.
- 4.4. Laktoza (CAS 5965-66-2), čistoće od najmanje 99 %.
- 4.5. Maltoza-monohidrat (CAS 6363-53-7), čistoće od najmanje 99 %.
- 4.6. Čisti acetonitril (CAS 75-05-8) za HPLC analizu.
- 4.7. Destilirana ili demineralizirana voda, ako je moguće mikrofiltrirana.

4.8. Otapala (primjer)

Otapalo za eluciju sastoji se od sljedećeg:

75 dijelova po volumenu acetonitrila (4.6.),

25 dijelova po volumenu destilirane vode (4.7.).

Radi degaziranja, sporo propuštati helij 5 do 10 minuta prije upotrebe.

Ako voda koja se upotrebljava nije mikrofiltrirana, otapalo je potrebno filtrirati s pomoću filtra za organska otapala s veličinom pora koja je manja ili jednaka 0,45 µm.

- 4.9. Apsolutni etanol (CAS 64-17-5).
- 4.10. Otopina etanola (5 %, v/v).
- 4.11. Pripravak matične standardne otopine (20 g/l).

Odvagne se 2 g svakog od šećera za analizu (4.1. do 4.5.), prenese ih se bez gubitka u odmjernu tikvicu od 100 ml. (Napomena: 2,11 g maltoze monohidrata je ekvivalent 2 g maltoze).

Dopuni se do 100 ml petpostotnom alkoholnom otopinom (4.10.), protrese i čuva na oko + 4 °C. Nova radna otopina priprema se jednom tjedno.

4.12. Priprema radnih standardnih otopina (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 i 20,0 g/l)

Razrijedi se matična otopina, 20 g/l (4.11.) petpostotnom alkoholnom otopinom (4.10.) radi dobivanja pet radnih standardnih otopina od 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 i 20,0 g/l. Filtrirati s pomoću filtra s veličinom pora koja je manja ili jednaka 0,45 µm (5.3.).

5. Uređaji i oprema

5.1. HPLC sustav kojim se može postići rezolucija svih šećera po baznoj liniji.

5.1.1. Visokodjelotvorni tekućinski kromatograf sa šestostranim ventilom za ubrizgavanje opremljenim petljom od 10 µl ili bilo kojim drugim automatskim ili ručnim uređajem za pouzdano ubrizgavanje mikrovolumena.

5.1.2. Sustav pumpi koji omogućuje postizanje i održavanje stalne ili programirane brzine protoka s visokom preciznošću.

5.1.3. Diferencijalni refraktometar.

5.1.4. Računalni integrator ili uređaj za snimanje čiji rad je kompatibilan s ostatkom sustava.

5.1.5. Predkolona:

Preporučuje se da predkolona bude pričvršćena na analitičku kolonu.

5.1.6. Kolona (primjer):

Materijal: nehrđajući čelik ili staklo.

Unutarnji promjer: 2 – 5 mm.

Duljina: 100 – 250 mm (ovisno o veličini čestica punila), na primjer 250 mm ako je promjer čestica 5 µm.

Stacionarna faza: funkcionalne skupine alkil amina, vezane na silicijevi dioksid maksimalne veličine čestica od 5 µm.

5.1.7. Kromatografski uvjeti (primjer):

otapalo za eluciju (4.8.), brzina protoka: 1 ml/minuta.

Detekcija: diferencijalna refraktometrija.

Kako bi se osigurala potpuna stabilnost detektora, potrebno ga je uključiti nekoliko sati prije upotrebe. Referentnu čeliju potrebno je napuniti otapalom za eluciju.

5.2. Analitička vaga s preciznošću očitavanja od 0,1 mg.

5.3. Pribor za filtraciju malih volumena upotrebom mikromembrane od 0,45 µm.

6. Skladištenje uzoraka

Uzorke se po primitku skladišti na sobnoj temperaturi prije analize.

7. Postupak

7.1. DIO A: Priprema uzorka

7.1.1. Protresti uzorak.

7.1.2. Filtrirati uzorak kroz filter s veličinom pora koja je manja ili jednaka 0,45 µm (5.3.).

7.2. DIO B: HPLC

7.2.1. Određivanje

Ubrizgati 10 µL standardnih otopina (4.12.) i uzoraka (7.1.2.). Analizu provesti u prikladnim kromatografskim uvjetima, na primjer onima prethodno opisanima.

- 7.2.2. Ako određeni vršak uzorka ima veću površinu (ili visinu) od odgovarajućeg vrška u standardu najveće koncentracije, taj bi uzorak trebalo razrijediti destiliranom vodom i ponovno ga analizirati.

8. Izračun

Usporediti dva kromatograma dobivena za standardnu otopinu i jako alkoholno piće. Identificirati vrške na temelju njihovih vremena retencije. Izmjeriti njihove površine (ili visine) kako bi se izračunala koncentracija metodom vanjskog standarda. Uzeti u obzir sva razrjeđenja uzorka.

Konačni je rezultat zbroj saharoze, maltoze, laktoze, glukoze i fruktoze izražen kao invertni šećer u g/l.

Invertni šećer izračunava se kao zbroj svih prisutnih monosaharida i reducirajućih disaharida uvećan za stehiometrijsku količinu glukoze i fruktoze izračunanu na temelju prisutne saharoze.

$$\begin{aligned} \text{Invertni šećer (g/l)} &= \text{glukoza (g/l)} + \text{fruktoza (g/l)} + \text{maltoza (g/l)} + \text{laktoza (g/l)} + (\text{saharoza (g/L)} \times 1,05) \\ 1,05 &= (\text{molekularna masa fruktoze} + \text{molekularna masa glukoze}) / \text{molekularna masa saharoze} \end{aligned}$$

9. Svojstva metode (preciznost)

9.1. Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Sljedeći podaci su dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima [1] [2].

Godina međulaboratorijskog ispitivanja 2000.

Broj laboratorija 24

Broj uzoraka 8

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

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

Tablica 1.

Fruktoza, glukoza, maltoza

Analit	Fruktoza		Glukoza			Maltoza	
Uzorci (× 2)	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Jako alkoholno piće aromatizirano anisom	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Jako alkoholno piće aromatizirano anisom	Standard (10 g/l)
Srednja vrijednost [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Broj laboratorija bez ekstremnih vrijednosti	21	22	21	23	19	21	22
Standardna devijacija ponovljivosti, s _r [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analit	Fruktoza		Glukoza			Maltoza	
Uzorci (× 2)	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Jako alkoholno piće aromatizirano anisom	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Jako alkoholno piće aromatizirano anisom	Standard (10 g/l)
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tablica 2.

Saharoza

Analit	Saharoza					
Uzorci	Pastis	Ouzo	Liker od trešanja	Crème de menthe	Crème de cassis	Standard (100 g/l)
Srednja vrijednost [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Broj laboratorija bez ekstremnih vrijednosti	19	19	20	18	18	18
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) Razina razdiobe.

Tablica 3.

Ukupni šećer

(Napomena: ovi su podatci izračunani za ukupan šećer, a ne invertni šećer definiran u prethodnom odjeljku 8.)

Uzorci	Pastis	Ouzo	Jako alkoholno piće aromatizirano anisom	Liker od trešanja	Crème de menthe	Crème de cassis	Standard (220 g/l)
Srednja vrijednost [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Broj laboratorija bez ekstremnih vrijednosti	20	19	20	20	18	18	19
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) Razina razdiobe."

4. Dodaje se sljedeće poglavlje X.:

„X. **ODREĐIVANJE SLJEDEĆIH SPOJEVA IZ DRVETA U JAKIM ALKOHOLNIM PIĆIMA VISOKODJELOTVORNOM TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM (HPLC): FURFURAL, 5-HIDROKSIMETILFURFURAL, 5-METILFURFURAL, VANILIN, SIRINGALDEHID, KONIFERALDEHID, SINAPALDEHID, GALNA KISELINA, ELAGIČNA KISELINA, VANILINSKA KISELINA, SIRINGIČNA KISELINA I SKOPOLETIN**

1. Područje primjene

Metoda se odnosi na određivanje furfurala, 5-hidroksimetilfurfurala, 5-metilfurfurala, vanilina, siringaldehida, koniferaldehida, sinapaldehida, galne kiseline, elagične kiseline, vanilinske kiseline, siringične kiseline i skopoletina visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom.

2. Normativni izvori

Metoda analize koju je priznala Glavna skupština Međunarodne organizacije za vinovu lozu i vino (OIV), a OIV ju je objavio pod referentnim brojem OIV-MA-BS-16: R2009.

3. Načelo

Određivanje visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) uz detekciju ultraljubičastom spektrofotometrijom na nekoliko valnih duljina te fluorescentnom spektroskopijom.

4. Reagensi

Reagensi moraju biti analitičke čistoće. Mora se upotrebljavati destilirana voda ili voda barem jednake čistoće. Najbolje je upotrebljavati mikrofiltriranu vodu otpornosti od 18,2 M Ω .cm.

4.1. 96 %-tni alkohol.

4.2. Metanol kvalitete primjerene za HPLC (otapalo B).

4.3. Octena kiselina razrijeđena do 0,5 % volumnog udjela (otapalo A).

4.4. Pokretne faze: (navedeno samo kao primjer).

Otapalo A (0,5 %-tna octena kiselina) i otapalo B (čisti metanol). Filtrirati kroz membranu (poroznosti od 0,45 μ m). Degazirati u ultrazvučnoj kupelji ako je to potrebno.

4.5. Referentni standardi čistoće najmanje 99 %: furfural, 5-hidroksimetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilin, siringaldehid, koniferaldehid, sinapaldehid, galna kiselina, elagična kiselina, vanilinska kiselina, siringična kiselina i skopoletin.

4.6. Referentna otopina: standardne tvari razrjeđuju se u 50 %-tnoj otopini vode i alkohola. Konačne koncentracije u referentnoj otopini trebale bi biti sljedeće:

furfural: 5 mg/l; 5-hidroksimetilfurfural: 10 mg/l; 5-metilfurfural 2 mg/l; vanilin: 5 mg/l; siringaldehid 10 mg/l; koniferaldehid 5 mg/l; sinapaldehid: 5 mg/l; galna kiselina 10 mg/l; elagična kiselina 10 mg/l; vanilinska kiselina: 5 mg/l; siringična kiselina 5 mg/l; skopoletin: 0,5 mg/l.

5. Oprema

Standardna laboratorijska aparatura

5.1. Visokodjelotvorni tekućinski kromatograf koji može funkcionirati u binarnom gradijentu i opremljen je:

5.1.1. Spektrofotometrijskim detektorom koji može mjeriti na valnim duljinama od 260 do 340 nm. Međutim, preporučuje se raditi s detektorom za više valnih duljina s diodnim nizom ili sličnim detektorom kako bi se potvrdila čistoća vršaka.

5.1.2. Detektor za fluorescentnu spektroskopiju – valna duljina ekscitacije: 354 nm, valna duljina emisije: 446 nm (za određivanje tragova skopoletina; moguće ga je detektirati i na 313 nm spektrofotometrijom).

5.1.3. Uređaj za ubrizgavanje kojim se može unijeti 10 ili 20 μ l (na primjer) uzoraka za ispitivanje.

5.1.4. Kolona visokodjelotvornog tekućinskog kromatografa, tipa RP C18, najveća veličina čestica od 5 μ m.

5.2. Šprice za HPLC.

5.3. Uređaj za membransku filtraciju malih volumena.

5.4. Računalni integrator ili uređaj za snimanje čiji je rad kompatibilan sa svom opremom, a posebno mora imati nekoliko ulaznih kanala.

6. Postupak

6.1. Priprema otopine za ubrizgavanje

Referentna otopina i jako alkoholno piće filtriraju se, prema potrebi, kroz membranu s najvećim promjerom pora od 0,45 μ m.

- 6.2. Kromatografski radni uvjeti: analizu je potrebno provoditi na sobnoj temperaturi s pomoću opreme opisane u točki 5.1. upotrebom pokretnih faza (4.4.) s protokom od približno 0,6 ml po minuti u skladu s gradijentom navedenim u nastavku (naveden samo kao primjer):

vrijeme: 0 min 50 min 70 min 90 min

otapalo A (voda – kiselina): 100 % 60 % 100 % 100 %

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

U određenim slučajevima gradijent bi trebalo izmijeniti kako bi se izbjegle koelucije.

6.3. Određivanje

- 6.3.1. Ubrizgati referentne standarde odvojeno, a zatim pomiješano.

Prilagoditi radne uvjete kako bi faktori rezolucije vršaka svih spojeva iznosili najmanje 1.

- 6.3.2. Ubrizgati uzorak pripremljen u skladu s točkom 6.1.

- 6.3.3. Izmjeriti površinu vršaka u referentnoj otopini i jakom alkoholnom piću te izračunati koncentracije.

7. Izražavanje rezultata

Izraziti koncentracije svih sastojaka u mg/l.

8. Svojstva metode (preciznost)

Sljedeći su podatci dobiveni 2009. iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode provedenog na više jakih alkoholnih pića u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima [1], [2].

8.1. Furfural

Analit	Furfural					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	15	15	15	15	15	15
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	14	12	13	14	13	13
Srednja vrijednost [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analit	Furfural					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	8	15	5	13	3	5
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-hidroksimetilfurfural

Analit	5-hidroksimetilfurfural					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	16	16	16	16	16	16
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	14	14	14	14	14	14
Srednja vrijednost [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-metilfurfural

Analit	5-metilfurfural					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	11	11	11	11	11	11
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	11	11	8	11	10	11
Srednja vrijednost [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanilin

Analit	Vanilin					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	16	15	16	16	16	16
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	16	15	16	16	16	16
Srednja vrijednost [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analit	Vanilin					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Siringaldehid

Analit	Siringaldehid					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	16	15	16	16	16	16
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	13	13	13	12	14	13
Srednja vrijednost [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Koniferaldehid

Analit	Koniferaldehid					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	13	12	13	12	13	13
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	12	12	13	12	13	13
Srednja vrijednost [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinapaldehid

Analit	Sinapaldehid					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	14	14	14	14	15	14
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	14	13	12	13	13	12
Srednja vrijednost [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analit	Sinapaldehid					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Galna kiselina

Analit	Galna kiselina					
Uzorak	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	16	15	16	16	16	16
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	15	14	16	16	16	16
Srednja vrijednost [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Elagična kiselina

Analit	Elagična kiselina					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	7	7	7	7	7	7
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	7	7	7	7	7	6
Srednja vrijednost [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Vanilinska kiselina

Analit	Vanilinska kiselina					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	15	15	15	15	15	15
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	12	11	14	14	15	14
Srednja vrijednost [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analit	Vanilinska kiselina					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Siringična kiselina

Analit	Siringična kiselina					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	16	15	16	16	16	16
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	16	15	15	15	16	15
Srednja vrijednost [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Granica obnovljivosti, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Skopoletin

Analit	Skopoletin					
Uzorci	Viski	Brandy	Rum	Konjak 1	Bourbon	Konjak 2
Broj laboratorija koji sudjeluju	10	10	10	10	10	10
Broj prihvaćenih rezultata (laboratorija)	9	8	9	8	8	8
Srednja vrijednost [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Standardna devijacija ponovljivosti, s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Relativna standardna devijacija ponovljivosti, RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Granica ponovljivosti, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Standardna devijacija obnovljivosti, s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Relativna standardna devijacija obnovljivosti, RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Granica obnovljivosti, 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.) *Pure and Applied Chemistry* 67, 332. – 343.

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