

II

(Ne teisėkūros procedūra priimami aktai)

REGLAMENTAI

KOMISIJOS ĮGYVENDINIMO REGLAMENTAS (ES) 2016/635

2016 m. balandžio 22 d.

kuriuo iš dalies keičiamos Reglamento (EB) Nr. 2870/2000 priedo nuostatos dėl spiritinių gėrimų analizės tam tikrų etaloninių metodų

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2008 m. sausio 15 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 110/2008 dėl spiritinių gėrimų apibrėžimo, apibūdinimo, pateikimo, ženklavimo ir geografinių nuorodų apsaugos bei panaikinančią Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 1576/89 ⁽¹⁾, ypač į jo 28 straipsnio 2 dalį,

kadangi:

- (1) Komisijos reglamente (EB) Nr. 2870/2000 ⁽²⁾ išvardyti ir apibūdinti spiritinių gėrimų analizės etaloniniai metodai. Tačiau kai kurie to reglamento priede išvardyti metodai, įskaitant lakiojo rūgštingumo ir suminio cukrų kiekio spiritiniuose gėrimuose nustatymo metodus, dar neapibūdinti;
- (2) tam tikrų spiritinių gėrimų lakiojo rūgštingumo ir suminio cukrų kiekio nustatymo metodų tinkamumas buvo įvertintas dviem tarptautiniais tinkamumo patvirtinimo tyrimais, vykdytais pagal tarptautines suderintas metodikas, kuriuos atlikus nustatyta, kad metodų veiksmingumo parametrai yra priimtini. Tyrimai atlikti vykstant mokslinių tyrimų projektą pagal Europos Komisijos (EK) IV bendrąją standartinių matavimų ir bandymų programą. Todėl tų metodų aprašymas turėtų būti įtrauktas į Reglamento (EB) Nr. 2870/2000 priedą;
- (3) Reglamente (EB) Nr. 110/2008 išdėstyti reikalavimai, taikomi medinėse statinėse brandinamiems kai kurių kategorijų spiritiniams gėrimams, ir nustatyta, kad taip brandinti galima ir kitus spiritinius gėrimus. Svarbiausių medienos junginių analizė gali padėti nuspręsti, ar mėginys atitinka tam tikros kategorijos spiritinio gėrimo apibrėžtį. Analizės metodą šiems junginiams nustatyti yra patvirtinusi Tarptautinė vynuogių ir vyno organizacija (OIV) Rezoliucijoje OIV/OENO 382A/2009. Metodas patvirtintas remiantis duomenimis, gautais atlikus tarptautinį metodo veiksmingumo tyrimą, kuriame laikantis tarptautinių suderintų metodikų buvo analizuojami įvairūs spiritiniai gėrimai. Todėl šį metodą ir jo aprašymą derėtų įtraukti į spiritinių gėrimų analizės Sąjungos etaloninių metodų sąrašą, nustatytą Reglamento (EB) Nr. 2870/2000 priede;
- (4) todėl Reglamentas (EB) Nr. 2870/2000 turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeistas;
- (5) šiame reglamente numatytos priemonės atitinka Spiritinių gėrimų komiteto nuomonę,

⁽¹⁾ O L L 39, 2008 2 13, p. 16.

⁽²⁾ 2000 m. gruodžio 19 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 2870/2000, nustatantis spiritinių gėrimų analizės Bendrijos etaloninius metodus (O L L 333, 2000 12 29, p. 20).

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamento (EB) Nr. 2870/2000 priedas iš dalies keičiamas pagal šio reglamento priedą.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2016 m. balandžio 22 d.

Komisijos vardu
Pirmininkas
Jean-Claude JUNCKER

PRIEDAS

Reglamento (EB) Nr. 2870/2000 priedas iš dalies keičiamas taip:

1. Turinys iš dalies keičiamas taip:

a) III.3 ir VIII punktuose išbraukiama „(p.m.)“;

b) įtraukiamas šis punktas:

„X. Medienos cheminių junginių – 2-furaldehido, 5-hidroksimetil-2-furaldehido, 5-metil-2-furaldehido, vanilino, alyvų aldehido, koniferilo aldehido, sinapo aldehido, galo rūgšties, elago rūgšties, vanilino rūgšties, alyvų rūgšties ir skopoletino – nustatymas.“

2. III skyrius papildomas šia dalimi:

„III.3. SPIRITINIŲ GĖRIMŲ LAKIOJO RŪGŠTINGUMO NUSTATYMAS

1. **Taikymo sritis**

Metodas buvo patvirtintas atliekant tarplaboratorinį romo, brendžio, vaisių išspaudų ir vaisių spiritinių gėrimų tyrimą esant koncentracijai nuo 30 mg/l iki 641 mg/l.

2. **Norminės nuorodos**

ISO 3696:1987. Analizės vanduo. Apibūdinimas ir bandymo metodai.

3. **Apibrėžtys**

3.1. Lakusis rūgštingumas apskaičiuojamas iš suminio rūgštingumo atėmus pastovųjį rūgštingumą.

3.2. Suminį rūgštingumą sudaro titruojamojo rūgštingumo verčių suma.

3.3. Pastovusis rūgštingumas yra iki sausojo likučio išgarinto spiritinio gėrimo rūgštingumas.

4. **Principas**

Suminis rūgštingumas ir pastovusis rūgštingumas nustatomi titravimo arba potenciometrinio metodu.

5. **Reagentai ir medžiagos**

Jei nenurodyta kitaip, analizei turi būti naudojami tik patvirtinti analiziškai gryni reagentai ir bent 3 klasės vanduo, apibrėžtas ISO 3696:1987.

5.1. 0,01 mol/l natrio hidroksido tirpalas (NaOH)

5.2. Mišriojo indikatoriaus tirpalas:

Pasveriamą 0,1 g indigokarmino ir 0,1 g fenolio raudonojo.

Ištirpinama 40 ml vandens ir skiedžiama iki 100 ml etanolio.

6. **Aparatūra ir įranga**

Pagalbinė laboratorinė aparatūra, A klasės stikliniai indai ir ši įranga:

6.1. Vandens siurblys

- 6.2. Sukamasis garintuvas arba ultragarso vonia
- 6.3. Potenciometrinio titravimo įranga (pasirinktina)

7. Ėminių ėmimas ir ėminiai

Ėminiai prieš analizę laikomi kambario temperatūroje.

8. Procedūra

8.1. Suminis rūgštingumas

8.1.1. Ėminio paruošimas

Prireikus pašalinti anglies dioksidą, spiritinis gėrimas veikiamas ultragarsu (apdorojimo ultragarsu metodu) arba dvi minutes maišomas vakuume.

8.1.2. Titravimas

Į 500 ml kūginę kolbą pipete įpilami 25 ml spiritinio gėrimo.

Įpilama maždaug 200 ml atvėsinto virinto distiliuoto vandens (ruošiamo iš naujo kasdien) ir įlašinami 2–6 lašai mišriojo indikatoriaus tirpalo (5.2).

Titruojama 0,01 mol/l natrio hidroksido tirpalu (5.1), kol žaliai geltona spalva pasikeičia į violetinę, jei titruojami bespalviai spiritiniai gėrimai, arba rudai geltona spalva pasikeičia į raudonai rudą, jei titruojami rudos spalvos spiritiniai gėrimai.

Taip pat galima titruoti potenciometriniumi metodu iki pH 7,5.

Tarkime, kad buvo įpilta $n_{1\text{ ml}}$ 0,01 mol/l natrio hidroksido tirpalo.

8.1.3. Skaičiavimas

Suminis rūgštingumas (SR), išreikštas miliekivalentais litrui spiritinio gėrimo, yra lygus $0,4 \times n_1$.

Suminis rūgštingumas (SR'), išreikštas mg acto rūgšties litrui spiritinio gėrimo, yra lygus $24 \times n_1$.

8.2. Pastovusis rūgštingumas

8.2.1. Ėminio paruošimas

25 ml spiritinio gėrimo išgarinama iki sausojo likučio:

25 ml spiritinio gėrimo pipete įpilami į 55 mm skersmens plokščiadugnę cilindro formos garinimo lėkštelę. Pirmąją garinimo valandą garinimo lėkštelė statoma ant verdančio vandens vonios dangčio taip, kad neužvirtų skystis, nes gali būti nuostolių dėl jo taškymosi.

Džiovinimas baigiamas statant garinimo lėkštelę dviem valandoms į džiovinimo spintą 105 C temperatūroje. Garinimo lėkštelė paliekama atvėsti eksikatoriuje.

8.2.2. Titravimas

Po išgarinimo likęs likutis ištirpinamas atvėsintame virintame distiliuotame vandenyje (ruošiamas iš naujo kasdien), gautas tirpalas skiedžiamas maždaug iki 100 ml ir įlašinami 2–6 lašai mišriojo indikatoriaus tirpalo (5.2).

Titruojama 0,01 mol/l natrio hidroksido tirpalu (5.1).

Taip pat galima titruoti potenciometrinio metodu iki pH 7,5.

Tarkime, kad buvo įpilta $n_{2\text{ ml}}$ 0,01 mol/l natrio hidroksido tirpalo.

8.2.3. Skaičiavimas

Pastovusis rūgštingumas (PR), išreikštas miliekvivalentais litrai spiritinio gėrimo, yra lygus $0,4 \times n_2$.

Pastovusis rūgštingumas (PR'), išreikštas mg acto rūgšties litrai spiritinio gėrimo, yra lygus $24 \times n_2$.

9. Lakiojo rūgštingumo skaičiavimas

9.1. Išreiškiant miliekvivalentais litrai:

tarkime, kad:

SR – suminis rūgštingumas miliekvivalentais litrai,

PR – pastovusis rūgštingumas miliekvivalentais litrai.

Lakusis rūgštingumas LR, miliekvivalentais litrai, yra lygus:

SR – PR.

9.2. Išreiškiant mg acto rūgšties litrai:

tarkime, kad:

SR' – suminis rūgštingumas mg acto rūgšties litrai,

PR' – pastovusis rūgštingumas mg acto rūgšties litrai.

Lakusis rūgštingumas LR', mg acto rūgšties litrai, yra lygus:

SR' – PR'.

9.3. Išreiškiant g acto rūgšties hl grynojo 100 % tūrio alkoholio, rūgštingumas yra lygus: $\frac{SR' - PR'}{A} \times 10$,

čia: A – spiritinio gėrimo tūrinė alkoholio koncentracija.

10. Metodo efektyvumo charakteristikos (preciziškumas)

10.1. Tarplaboratorinio tyrimo statistiniai rezultatai

Šie duomenys buvo gauti atliekant tarptautinį metodo efektyvumo charakteristikų tyrimą, vykdytą pagal tarptautines suderintas metodikas [1] [2].

Tarplaboratorinio tyrimo metai **2000**

Laboratorių skaičius 18

Ėminių skaičius 6

Ėminiai	A	B	C	D	E	F
Laboratorių skaičius atmetus riktus	16	18	18	14	18	18
Riktų (laboratorių) skaičius	2			4		
Priimtų rezultatų skaičius	32	36	36	28	36	36
Vidutinė vertė (\bar{x}) [mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Pakartojamumo riba r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Atkuriamumo riba R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Ėminių tipai:

A Slyvų spiritas; dviejų skirtingų koncentracijos verčių ėminiai*

B Romas I; kartotiniai kontroliniai ėminiai

C Romas II; dviejų skirtingų koncentracijos verčių ėminiai*

D Slivovica; kartotiniai kontroliniai ėminiai

E Brendis; kartotiniai kontroliniai ėminiai

F Vynuogių išspaudų spiritas; kartotiniai kontroliniai ėminiai

[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, 67A–76A.“

3. Įterpiamas šis VIII skyrius:

„VIII. SUMINIS CUKRŲ KIEKIS

1. Taikymo sritis

Efektyviosios skysčių chromatografijos ir lūžio rodiklio matavimo (HPLC–RI) metodas taikomas spiritinių gėrimų suminiam cukrų kiekiui nustatyti (jį išreiškiant invertuotojo cukraus kiekiu), išskyrus likerius, kurių sudėtyje yra kiaušinių ir pieno produktų.

Metodas buvo patvirtintas atliekant tarplaboratorinį anyžių likerio (*pastis*), graikiško anyžių likerio, vyšnių likerio, kremo likerio (nurodant vaisiaus arba naudotos žaliavos pavadinimą) ir juodųjų serbentų kremo likerio tyrimą, esant nuo 10,86 g/l iki 509,7 g/l koncentracijai. Tačiau prietaiso atsako tiesiškumas buvo patvirtintas koncentracijai nuo 2,5 g/l iki 20,0 g/l.

Šis metodas nėra skirtas mažoms cukrų koncentracijos vertėms nustatyti.

2. Norminės nuorodos

ISO 3696:1987. Analizės vanduo. Apibūdinimas ir bandymo metodai.

3. Principas

Cukrų tirpalų analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu, kad būtų nustatyta juose esančios gliukozės, fruktozės, sacharozės, maltozės ir laktozės koncentracija.

Taikant šį metodą, kaip pavyzdys naudojama alkilaminų nejudančioji fazė ir aptikimas diferencinės refraktometrijos metodu. Taip pat kaip nejudančiąją fazę būtų galima naudoti anijonitines dervas.

4. Reagentai ir medžiagos

- 4.1. Gliukozė (CAS 50–99–7), ne mažesnio kaip 99 % grynumo.
- 4.2. Fruktozė (CAS 57–48–7), ne mažesnio kaip 99 % grynumo.
- 4.3. Sacharozė (CAS 57–50–1), ne mažesnio kaip 99 % grynumo.
- 4.4. Laktozė (CAS 5965–66–2), ne mažesnio kaip 99 % grynumo.
- 4.5. Maltozės monohidratas (CAS 6363–53–7), ne mažesnio kaip 99 % grynumo.
- 4.6. Grynas acetonitrilas (CAS 75–05–8) HPLC analizei.
- 4.7. Distiliuotas ar demineralizuotas vanduo, pageidautina filtruotas per mikrofiltrą.

4.8. Tirpikliai (pavyzdys)

Eliuavimo tirpiklį sudaro:

75 tūrio dalys acetonitrilo (4.6),

25 tūrio dalys distiliuoto vandens (4.7).

Degazuojama 5–10 minučių leidžiant nestiprią helio srovę.

Jei naudojamas vanduo nebuvo filtruotas per mikrofiltrą, tirpiklis turi būti filtruojamas per organiniams tirpikliams skirtą filtrą, kurio akučių dydis lygus 0,45 µm arba mažesnis.

4.9. Absoliutusias etanolis (CAS 64–17–5).

4.10. Etanolio tirpalas (5 % tūrio).

4.11. Pradinio etaloninio tirpalo (20 g/l) paruošimas

Pasveriami po 2 g kiekvieno analizuojamo cukraus (4.1–4.5) ir visi svėriniai be nuostolių suberiami į 100 ml matavimo kolbą. (NB. 2,11 g maltozės monohidrato atitinka 2 g maltozės).

Skiedžiama iki 100 ml 5 % tūrio etanolio tirpalu (4.10), tirpalas supurtomas ir laikomas maždaug + 4 °C temperatūroje. Naujas pradinis tirpalas ruošiamas kartą per savaitę.

4.12. Darbinių etaloninių tirpalų paruošimas (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ir 20,0 g/l)

Pradinis etaloninis tirpalas 20 g/l (4.11) atitinkamai skiedžiamas 5 % tūrio etanolio tirpalu (4.10), kad būtų gauti penki darbiniai 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ir 20,0 g/l etaloniniai tirpalai. Filtruojami per filtrą, kurio akučių dydis lygus 0,45 µm arba mažesnis (5.3.).

5. Aparatūra ir įranga

5.1. HPLC sistema, kuri visų cukrų smailes galėtų atskirti iki bazinės linijos.

5.1.1. Efektyvusis skysčių chromatografas su šešių padėčių įpurškimo vožtuvu, turinčiu 10 µl kilpą, arba koks nors kitas automatinis ar rankinis įtaisas mažiems tūriams patikimai įpurkšti.

5.1.2. Siurbimo sistema, kuria būtų galima labai preciziškai gauti ir užtikrinti pastovų arba programuojamą srautą.

5.1.3. Diferencinis refraktometras.

5.1.4. Skaičiuojamasis integratorius arba savirašis, kurio veikimas būtų suderintas su likusia įranga.

5.1.5. Prieškolonėlė:

prie analizės kolonėlės rekomenduojama prijungti tinkamą prieškolonėlę.

5.1.6. Kolonėlė (pavyzdys):

Medžiaga: nerūdijantysis plienas arba stiklas.

Vidinis skersmuo: 2–5 mm.

Ilgis: 100–250 mm (atsižvelgiant į įkrovos dalelių dydį, pavyzdžiui, 250 mm, jei dalelių skersmuo 5 µm.

Nejudančioji fazė: su silicio dioksidu sujungtos alkilamino funkcinės grupės, maksimalus dalelių dydis – 5 µm.

5.1.7. Chromatografinės analizės sąlygos (pavyzdys).

Eliuavimo tirpiklis (4.8.), srautas: 1 ml/min.

Aptikimas: diferencinė refraktometrija.

Siekiant užtikrinti visišką detektoriaus stabilumą, jį reikėtų įjungti kelias valandas prieš naudojimą. Į palyginamąją kiuvetę turi būti įpilta eliuavimo tirpiklio.

5.2. Analizinės svarstyklės, kurių tikslumas – 0,1 mg.

5.3. Mažų tūrių filtravimo įranga, naudojant 0,45 µm mikromembraną.

6. Ėminių laikymas

Gauti ėminiai prieš analizę laikomi kambario temperatūroje.

7. Procedūra

7.1. A DALIS. Ėminių ruošimas

7.1.1. Ėminys purtomas.

7.1.2. Ėminys filtruojamas per filtrą, kurio akučių dydis 0,45 µm arba mažesnis (5.3).

7.2. B DALIS. HPLC

7.2.1. Nustatymas

Įpurškama po 10 µl etaloninių tirpalų (4.12) ir Ėminių (7.1.2). Analizė atliekama tinkamomis chromatografinės analizės sąlygomis, pavyzdžiui, tokiomis, kurios aprašytos pirmiau.

- 7.2.2. Jei kuri nors ėminio smailė būtų didesnio ploto (ar aukščiau) nei atitinkama didžiausios koncentracijos etalono smailė, ėminių reikėtų praskiesti distiliuotu vandeniu ir analizuoti iš naujo.

8. Skaiciavimas

Palyginamos dvi – etaloninio tirpalo ir spiritinio gėrimo – chromatogramos. Smailės nustatomos pagal sulaikymo trukmės vertes. Matuojamas smailių plotas (ar aukštis), kad, taikant išorinio etalono metodą, būtų galima apskaičiuoti koncentracijos vertes. Atsižvelgiama į visus ėminio skiedimo veiksmus.

Galutinis rezultatas yra sacharozės, maltozės, laktozės, gliukozės ir fruktozės kiekio suma, išreikšta invertuotojo cukraus kiekiu (g/l).

Invertuotojo cukraus kiekis apskaičiuojamas kaip visų esamų monosacharidų ir redukuojančiųjų disacharidų suminis kiekis, pridėdant stechiometrinę gliukozės ir fruktozės kiekį, apskaičiuotą pagal esamą sacharozės kiekį.

$$\text{Invertuotasis cukrus (g/l)} = \text{gliukozė (g/l)} + \text{fruktozė (g/l)} + \text{maltozė (g/l)} + \text{laktozė (g/l)} + (\text{sacharozė (g/l)} \times 1,05)$$

$$1,05 = (\text{fruktozės molekulinė masė} + \text{gliukozės molekulinė masė}) / \text{sacharozės molekulinė masė}$$

9. Metodo efektyvumo charakteristikos (preciziškumas)

9.1. Tarplaboratorinio tyrimo statistiniai rezultatai

Šie duomenys buvo gauti atliekant tarptautinį metodo efektyvumo charakteristikų tyrimą, vykdytą pagal tarptautines suderintas metodikas [1] [2].

Tarplaboratorinio tyrimo metai 2000

Laboratorių skaičius 24

Ėminių skaičius 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, 67A–76A.

1 lentelė

Fruktozė, gliukozė, maltozė

Analitė	Fruktozė		Gliukozė			Maltozė	
	Juodųjų serbentų kremo likeris	Etalonas (50 g/l)	Anyžių skonio spiritinis gėrimas	Juodųjų serbentų kremo likeris	Etalonas (50 g/l)	Anyžių skonio spiritinis gėrimas	Etalonas (10 g/l)
Vidutinė vertė [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Laboratorių skaičius, atmetus riktus	21	22	21	23	19	21	22
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s _r [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analitė	Fruktozė		Gliukozė			Maltozė	
	Juodųjų serbentų kremo likeris	Etalonas (50 g/l)	Anyžių skonio spiritinis gėrimas	Juodųjų serbentų kremo likeris	Etalonas (50 g/l)	Anyžių skonio spiritinis gėrimas	Etalonas (10 g/l)
Ėminiai (× 2)							
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD _r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Pakartojamumo riba r [g/l] (r = 2,8 × s _r)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s _R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD _R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Atkuriamumo riba R [g/l] (R = 2,8 × s _R)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

2 lentelė

Sacharozė

Analitė	Sacharozė					
	Anyžių likeris (pastis)	Ouzo (graikiškas anyžių likeris)	Vyšnių likeris	Mėtinis kremo likeris	Juodųjų serbentų kremo likeris	Etalonas (100 g/l)
Vidutinė vertė [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Laboratorių skaičius, atmetus riktus	19	19	20	18	18	18
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s _r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD _r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Pakartojamumo riba R [g/l] (R = 2,8 × s _R)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s _R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD _R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Atkuriamumo riba R [g/l] (R = 2,8 × s _R)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) Dviejų skirtingų koncentracijos verčių ėminiai.

3 lentelė

Suminis cukrų kiekis

(Pastaba. Šie duomenys buvo apskaičiuoti kaip suminis cukrų kiekis, o ne invertuotojo cukraus kiekis, apibrėžtas pirmiau 8 skirsnyje.)

Ėminiai	Anyžių likeris (pastis)	Ouzo (graikiškas anyžių likeris)	Anyžių skonio spiritinis gėrimas	Vyšnių likeris	Mėtinis kremo likeris	Juodųjų serbentų kremo likeris	Etalonas (220 g/l)
Vidutinė vertė [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Laboratorių skaičius, atmetus riktus	20	19	20	20	18	18	19
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Pakartojamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) Dviejų skirtingų koncentracijos verčių ėminiai.

4. Įtraukiamas šis X skyrius:

„X. **MEDIENOS CHEMINIŲ JUNGINIŲ – 2-FURALDEHIDO, 5-HIDROKSIMETIL-2-FURALDEHIDO, 5-METIL-2-FURALDEHIDO, VANILINO, ALYVŲ ALDEHIDO, KONIFERILO ALDEHIDO, SINAPO ALDEHIDO, GALO RŪGŠTIES, ELAGO RŪGŠTIES, VANILINO RŪGŠTIES, ALYVŲ RŪGŠTIES IR SKOPOLETINO – NUSTATYMAS SPIRITINIUISE GĖRIMUISE EFEKTYVIOSIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU (HPLC)**

1. **Taikymo sritis**

Metodas susijęs su 2-furaldehido, 5-hidroksimetil-2-furaldehido, 5-metil-2-furaldehido, vanilino, alyvų aldehido, koniferilo aldehido, sinapo aldehido, galo rūgšties, elago rūgšties, vanilino rūgšties, alyvų rūgšties ir skopoletino nustatymu efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

2. **Norminės nuorodos**

Analizės metodas, kurį patvirtino Tarptautinės vynuogių ir vyno organizacijos (OIV) Generalinė asamblėja ir OIV paskelbė kaip OIV-MA-BS-16:R2009.

3. **Principas**

Nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC), aptikimas taikant kelių bangos ilgių ultravioletinės spektrofotometrijos ir spektrofluorimetrijos metodus.

4. Reagentai

Turi būti naudojami analiziškai grynai reagentai. Naudojamas distiliuotas ar bent tokio paties grynumo vanduo. Pageidautina naudoti per mikrofiltrą filtruotą vandenį, kurio savitoji elektrinė varža $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$.

- 4.1. 96 % tūrio etanolis.
- 4.2. HPLC kokybės metanolis (B tirpiklis).
- 4.3. Acto rūgštis, praskiesta iki 0,5 % tūrio (A tirpiklis).
- 4.4. Judančiosios fazės (pateiktos tik kaip pavyzdys).

A tirpiklis (0,5 % acto rūgštis) ir B tirpiklis (grynas metanolis). Filtruojama per membraną (akučių dydis $0,45 \mu\text{m}$). Prireikus degazuojama ultragarso vonioje.

- 4.5. Ne mažesnio kaip 99 % grynumo 2-furaldehido, 5-hidroksimetil-2-furaldehido, 5-metil-2-furaldehido, vanilino, alyvų aldehido, koniferilo aldehido, sinapo aldehido, galo rūgštis, elago rūgštis, vanilino rūgštis, alyvų rūgštis ir skopoletino pamatiniai etalonai.
- 4.6. Etaloninis tirpalas: etaloninės medžiagos ištirpinamos 50 % tūrio vandeniniame etanolio tirpale. Galutinės etaloninio tirpalo koncentracijos vertės turėtų būti tokios:

2-furaldehido – 5 mg/l; 5-hidroksimetil-2-furaldehido – 10 mg/l; 5-metil-2-furaldehido – 2 mg/l; vanilino – 5 mg/l; alyvų aldehido – 10 mg/l; koniferilo aldehido – 5 mg/l; sinapo aldehido – 5 mg/l; galo rūgštis – 10 mg/l; elago rūgštis – 10 mg/l; vanilino rūgštis – 5 mg/l; alyvų rūgštis – 5 mg/l; skopoletino – 0,5 mg/l.

5. Aparatūra

Įprasta laboratorinė įranga

- 5.1. Didelio efektyvumo skysčių chromatografas, kuris gali veikti binarinio gradiento režimu ir turi:
 - 5.1.1. spektrofotometrinių detektorių, kuriuo būtų galima matuoti, kai bangos ilgis yra 260–340 nm. Tačiau pageidautina naudoti diodų matricos daugiabangį detektorių ar panašų įtaisą, kad būtų galima patvirtinti smailių grynumą;
 - 5.1.2. spektrofluorimetrinių detektorių, kurio sužadavimo bangos ilgis – 354 nm, emisijos bangos ilgis – 446 nm (skopoletino pėdsakams nustatyti; jį taip pat galima aptikti spektrofotometriniu metodu, kai bangos ilgis yra 313 nm).
 - 5.1.3. Įpurškimo įtaisas, kuriuo būtų galima įpurkšti (pavyzdžiui) 10 ar 20 μl tiriamojo ėminio.
 - 5.1.4. Didelio efektyvumo skysčių chromatografijos kolonėlė, RP C18 tipo, maksimalus dalelių dydis – $5 \mu\text{m}$.
- 5.2. HPLC skirti švirkštai.
- 5.3. Mažo tūrio filtravimo per membraną įtaisas.
- 5.4. Integratorius-kompiuteris arba savirašis, kurio veikimas būtų suderintas su visa aparatūra, bet pirmiausia jis turi turėti kelis duomenų registravimo kanalus.

6. Procedūra

- 6.1. Įpurškiamo tirpalo ruošimas

Etaloninis tirpalas ir spiritinis gėrimas prireikus filtruojami per membraną, kurios akučių maksimalus skersmuo yra $0,45 \mu\text{m}$.

- 6.2. Chromatografinės analizės atlikimo sąlygos: analizė atliekama kambario temperatūroje 5.1 punkte nurodyta įranga, naudojant judančiąsias fazes (4.4), kurių srautas maždaug 0,6 ml per minutę pagal toliau pateiktą gradientą (pateiktas tik kaip pavyzdys)

Laikas: 0 min 50 min 70 min 90 min

A tirpiklis (vanduo ir rūgštis): 100 % 60 % 100 % 100 %

B tirpiklis (metanolis): 0 % 40 % 0 % 0 %

Atkreipiamas dėmesys į tai, kad tam tikrais atvejais šį gradientą reikėtų keisti, kad būtų išvengta junginių išplovimo kartu.

- 6.3. Nustatymas

- 6.3.1. Atskirai įpurškiami pamatiniai etalonai, o vėliau – jų mišinys.

Atlikimo sąlygos suderinamos taip, kad visų junginių smailių skyros faktoriai būtų lygūs bent 1.

- 6.3.2. Įpurškiamas pagal 6.1 punktą paruoštas ėminys.

- 6.3.3. Matuojamas visų etaloninio tirpalo ir spiritinio gėrimo smailių plotas ir apskaičiuojamos koncentracijos vertės.

7. Rezultatų išraiška

Kiekvienos sudedamosios dalies koncentracija išreiškiama mg/l.

8. Metodo efektyvumo charakteristikos (preciziškumas)

Šie duomenys buvo gauti 2009 m. atliekant įvairių spiritinių gėrimų analizės metodo efektyvumo charakteristikų tarptautinį tyrimą, vykdytą pagal tarptautines suderintas metodikas [1] [2].

8.1. 2-furalaldehididas

Analitė	2-furalaldehididas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Ėminiai						
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	15	15	15	15	15	15
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	14	12	13	14	13	13
Vidutinė vertė [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analitė	2-furaldehidas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	8	15	5	13	3	5
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-hidroksimetil-2-furaldehidas

Analitė	5-hidroksimetil-2-furaldehidas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	16	16	16	16	16	16
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	14	14	14	14	14	14
Vidutinė vertė [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-metil-2-furaldehididas

Analitė	5-metil-2-furaldehididas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Ėminiai						
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	11	11	11	11	11	11
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	11	11	8	11	10	11
Vidutinė vertė [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanilinas

Analitė	Vanilinas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Ėminiai						
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	16	15	16	16	16	16
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	16	15	16	16	16	16
Vidutinė vertė [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analitė	Vanilinas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Alyvų aldehidas

Analitė	Alyvų aldehidas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	16	15	16	16	16	16
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	13	13	13	12	14	13
Vidutinė vertė [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Koniferilo aldehidas

Analitė	Koniferilo aldehidas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Ėminiai						
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	13	12	13	12	13	13
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	12	12	13	12	13	13
Vidutinė vertė [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinapo aldehidas

Analitė	Sinapo aldehidas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Ėminiai						
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	14	14	14	14	15	14
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	14	13	12	13	13	12
Vidutinė vertė [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analitė	Sinapo aldehidai					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Galo rūgštis

Analitė	Galo rūgštis					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	16	15	16	16	16	16
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	15	14	16	16	16	16
Vidutinė vertė [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Elago rūgštis

Analitė	Elago rūgštis					
Ėminiai	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	7	7	7	7	7	7
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	7	7	7	7	7	6
Vidutinė vertė [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Vanilino rūgštis

Analitė	Vanilino rūgštis					
Ėminiai	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	15	15	15	15	15	15
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	12	11	14	14	15	14
Vidutinė vertė [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analitė	Vanilino rūgštis					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Alyvų rūgštis

Analitė	Alyvų rūgštis					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	16	15	16	16	16	16
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	16	15	15	15	16	15
Vidutinė vertė [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Atkuriamumo riba R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Skopoletinas

Analitė	Skopoletinas					
	Viskis	Brendis	Romas	Konjakas 1	Burbonas	Konjakas 2
Ėminiai						
Dalyvaujančių laboratorijų skaičius	10	10	10	10	10	10
Priimtų rezultatų (laboratorijų) skaičius	9	8	9	8	8	8
Vidutinė vertė [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Pakartojamumo riba r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Atkuriamumo riba 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, 67A–76A.“