

II

(Acte fără caracter legislativ)

REGULAMENTE

REGULAMENTUL DE PUNERE ÎN APLICARE (UE) 2016/635 AL COMISIEI

din 22 aprilie 2016

de modificare a anexei la Regulamentul (CE) nr. 2878/2000 în ceea ce privește anumite metode de referință pentru analiza băuturilor spirtoase

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (CE) nr. 110/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 15 ianuarie 2008 privind definirea, desemnarea, prezentarea, etichetarea și protecția indicațiilor geografice ale băuturilor spirtoase și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 1576/89 al Consiliului ⁽¹⁾, în special articolul 28 alineatul (2),

întrucât:

- (1) Regulamentul (CE) nr. 2870/2000 al Comisiei ⁽²⁾ enumeră și descrie metodele de referință pentru analiza băuturilor spirtoase. Cu toate acestea, anumite metode menționate în anexa la regulament, printre care se numără metodele de determinare a acidității volatile și a zaharurilor totale din băuturile spirtoase, nu sunt încă descrise.
- (2) Metodele de determinare a acidității volatile și a zaharurilor totale din anumite băuturi spirtoase au făcut obiectul a două studii internaționale de validare desfășurate în conformitate cu moduri de lucru acceptate la nivel internațional, iar parametrii de performanță a metodelor acestora au fost declarați acceptabili. Studiile au fost efectuate ca parte a unui proiect de cercetare în cadrul Programului de standarde, măsurători și testări (SMT) din Al patrulea program-cadru al Comisiei Europene (CE). Prin urmare, descrierea metodelor respective ar trebui inclusă în anexa la Regulamentul (CE) nr. 2870/2000.
- (3) Regulamentul (CE) nr. 110/2008 stabilește cerințe pentru anumite categorii de băuturi spirtoase care trebuie să se învechească în recipiente din lemn și prevede că alte categorii pot fi supuse unui astfel de proces de învechire. Analiza compușilor principali proveniți din lemn poate fi folositoare pentru a se stabili dacă o probă este conformă cu definiția corespunzătoare categoriei de băuturi spirtoase relevante. Organizația Internațională a Viei și Vinului (OIV) a recunoscut o metodă de analiză pentru determinarea respectivilor compuși în rezoluția sa OIV/OENO 382A/2009. Recunoașterea metodei s-a bazat pe datele obținute dintr-un studiu internațional de performanță a metodei pe diferite băuturi spirtoase, efectuat în conformitate cu moduri de lucru acceptate la nivel internațional. Prin urmare, metoda respectivă și descrierea acesteia ar trebui adăugate la metodele de referință ale Uniunii pentru analiza băuturilor spirtoase, prevăzute în anexa la Regulamentul (CE) nr. 2870/2000.
- (4) Prin urmare, Regulamentul (CE) nr. 2870/2000 ar trebui modificat în consecință.
- (5) Măsurile prevăzute de prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului pentru băuturi spirtoase,

⁽¹⁾ JO L 39, 13.2.2008, p. 16.

⁽²⁾ Regulamentul (CE) nr. 2870/2000 al Comisiei din 19 decembrie 2000 de stabilire a metodelor de comunitare de referință pentru analiza băuturilor spirtoase (JO L 333, 29.12.2000, p. 20).

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Anexa la Regulamentul (CE) nr. 2870/2000 se modifică în conformitate cu anexa la prezentul regulament.

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 22 aprilie 2016.

Pentru Comisie
Președintele
Jean-Claude JUNKER

ANEXĂ

Anexa la Regulamentul (CE) nr. 2870/2000 se modifică după cum urmează:

1. Cuprinsul se modifică după cum urmează:

(a) la punctele III.3 și VIII, termenul „(p.m.)” se elimină;

(b) se adaugă următorul punct:

„X. Determinarea compușilor din lemn: furfural, 5-hidroximetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilină, aldehydă siringică, aldehydă coniferică, sinapaldehydă, acid galic, acid elagic, acid vanilic, acid siringic și scopoletină.”

2. În capitolul III se adaugă următoarea parte:

„III.3. DETERMINAREA ACIDITĂȚII VOLATILE A BĂUTURILOR SPIRTOASE

1. **Domeniu de aplicare**

Metoda a fost validată printr-un test interlaboratoare pe rom, brandy, rachiu de tescovină și rachiu de fructe, la niveluri variind între la 30 mg/l și 641 mg/l.

2. **Referințe normative**

ISO 3696: 1987 Apă pentru uzul laboratoarelor de analiză – Specificații și metode de testare.

3. **Definiții**

3.1. Aciditatea volatilă se calculează prin scăderea acidității fixe din aciditatea totală.

3.2. Aciditatea totală reprezintă suma acidităților titrabile.

3.3. Aciditatea fixă reprezintă aciditatea rezidului rămas după evaporarea până la uscare a băuturii spirtoase.

4. **Principiu**

Aciditatea totală și aciditatea fixă sunt determinate prin titrare sau prin potențiometrie.

5. **Reactivi și materiale**

Pe durata analizei, dacă nu se specifică altfel, se utilizează doar reactivi cu grad analitic recunoscut și apă de cel puțin gradul 3, conform definiției din ISO 3696:1987.

5.1. Soluție de hidroxid de sodiu (NaOH) 0,01 M

5.2. Soluție indicator mixt:

Se cântărește 0,1 g de carmin indigo și 0,1 g de roșu de fenol.

Se dizolvă în 40 ml apă și se completează până la 100 ml cu etanol.

6. **Aparatură și echipamente**

Aparatură indirectă de laborator, sticlărie gradată A și următoarele:

6.1. Pompă de apă

- 6.2. Evaporator de tip rotativ sau o baie cu ultrasunete
- 6.3. Echipament pentru titrate potențiometrică (opțional)

7. Prelevare și probe

Probele se depozitează la temperatura camerei înainte de analiză.

8. Mod de lucru

8.1. Aciditate totală

8.1.1. Pregătirea probei

Băutura spirtoasă se iradiază cu ultrasunete (ultrasonicare) sau se agită timp de două minute în vid pentru a se elimina dioxidul de carbon, dacă este necesar.

8.1.2. Titrare

Se pipetează 25 ml din băutura spirtoasă într-un balon Erlenmeyer de 500 ml.

Se adaugă aproximativ 200 ml de apă distilată fiartă și răcită (proaspăt pregătită zilnic) și 2-6 picături de soluție indicator mixt (5.2).

Se titrează cu soluție de hidroxid de sodiu 0,01 M (5.1) până când culoarea galben-verzui devine violet în cazul băuturii spirtoase incolore și, respectiv, culoarea galben-marونی devine roșu-marونی în cazul băuturii spirtoase maronii.

Titarea se poate realiza, de asemenea, prin potențiometrie, până la pH 7,5.

Se notează cu n_1 ml volumul soluției de hidroxid de sodiu 0,01 M adăugate.

8.1.3. Calculare

Aciditatea totală (AT), exprimată în miliechivalenți pe litru de băutură spirtoasă, este egală cu $0,4 \times n_1$.

Aciditatea totală (AT'), exprimată în miligrame de acid acetic pe litru de băutură spirtoasă, este egală cu $24 \times n_1$.

8.2. Aciditate fixă

8.2.1. Pregătirea probei

Se lasă să se evapore 25 ml din băutura spirtoasă până la uscare:

Se pipetează 25 ml din băutura spirtoasă într-o placă cilindrică de evaporare cu fundul plat cu diametru de 55 mm. În timpul primei ore de evaporare, placa de evaporare se plasează pe capacul unei băi de apă la fierbere în așa fel încât lichidul să nu fiarbă, întrucât fierberea ar conduce la pierderi prin stropire.

Se finalizează uscarea așezând placa de evaporare într-un cuptor de uscare la 105 °C timp de două ore. Se lasă placa de evaporare să se răcească într-un desicator.

8.2.2. Titrare

Se dizolvă reziduul rămas după evaporarea cu apă distilată fiartă și răcită (proaspăt pregătită zilnic), se completează până la un volum de circa 100 ml și se adaugă 2-6 picături de soluție indicator mixt (5.2).

Se titrează cu soluție de hidroxid de sodiu 0,01 M (5.1).

Titrarea se poate realiza, de asemenea, prin potențimetrie, până la pH 7,5.

Se notează cu n_2 ml volumul soluției de hidroxid de sodiu 0,01 M adăugate.

8.2.3. Calculare

Aciditatea fixă (AF), exprimată în miliechivalenți pe litru de băutură spirtoasă, este egală cu $0,4 \times n_2$.

Aciditatea fixă (AF), exprimată în miligrame de acid acetic pe litru de băutură spirtoasă, este egală cu $24 \times n_2$.

9. Calcularea acidității volatile

9.1. Se exprimă în miliechivalenți pe litru:

Fie:

AT = aciditatea totală în miliechivalenți pe litru

AF = aciditatea fixă în miliechivalenți pe litru

Aciditatea volatilă, AV, în miliechivalenți pe litru, este egală cu:

$$AT - AF$$

9.2. Se exprimă în miligrame de acid acetic pe litru:

Fie:

AT' = aciditatea totală în miligrame de acid acetic pe litru

AF' = aciditatea fixă în miligrame de acid acetic pe litru

Aciditatea volatilă, AV, în miligrame de acid acetic pe litru, este egală cu:

$$AT' - AF'$$

9.3. Se exprimă în grame de acid acetic pe hl de alcool pur 100 % vol și este egală cu: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

unde A este tăria alcoolică în volume a băuturii spirtoase.

10. Caracteristici de performanță ale metodei (precizia)

10.1. Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Următoarele date au fost obținute dintr-un studiu internațional de performanță a metodei efectuat cu proceduri acceptate la nivel internațional [1] [2].

Anul testului interlaboratoare 2000

Numărul de laboratoare 18

Numărul de probe 6

Probe	A	B	C	D	E	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	16	18	18	14	18	18
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	2			4		
Numărul rezultatelor acceptate	32	36	36	28	36	36
Mean value ($\bar{x}$) [mg/L]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD _r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Limită de repetabilitate, r [mg/L]	23	10	42	10	19	24
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/L]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD _R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Limita de reproductibilitate, R [mg/L]	24	23	70	13	38	68

Tipuri de probe:

A Rachiul de prune; nivel de ramificare *

B Rom I; duplicate oarbe

C Rom II; nivel de ramificare*

D Șliboviță; duplicate oarbe

E Brandy; duplicate oarbe

F Rachiul de țescovină; duplicate oarbe

[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. Se introduce următorul capitol VIII:

„VIII. ZAHARURI TOTALE

1. Domeniu de aplicare

Metoda HPLC-RI se aplică pentru a determina zaharurile totale (exprimate ca zahăr invertit) din băuturile spirtoase, cu excepția lichiorurilor care conțin ouă și produse lactate.

Metoda a fost validată printr-un test interlaboratoare pentru pastis, anason distilat, lichior de cireșe, „crème de” (urmată de numele fructului sau al materiei prime utilizate) și „crème de cassis”, la niveluri variind între 10,86g/l și 509,7 g/l. Cu toate acestea, linearitatea răspunsului instrumentului a fost dovedită pentru o concentrație variind între 2,5 g/l și 20,0 g/l.

Această metodă nu este destinată determinării conținuturilor scăzute de zaharuri.

2. Referințe normative

ISO 3696:1987 Apă pentru uzul laboratoarelor de analiză – Specificații și metode de testare.

3. Principiu

Cromatografia lichidă de înaltă performanță testează soluțiile de zahăr, pentru a le stabili concentrațiile de glucoză, fructoză, zaharoză, maltoză și lactoză.

Această metodă utilizează o fază staționară de alchilamină și detectarea refractometriei diferențiale și este prezentată ca exemplu. Este posibilă și utilizarea rășinilor schimbătoare de anioni ca fază staționară.

4. Reactivi și materiale

4.1. Glucoză (CAS 50-99-7), cu o puritate de minimum 99 %.

4.2. Fructoză (CAS 57-48-7), cu o puritate de minimum 99 %.

4.3. Zaharoză (CAS 57-50-1), cu o puritate de minimum 99 %.

4.4. Lactoză (CAS 5965-66-2), cu o puritate de minimum 99 %.

4.5. Maltoză monohidrată (CAS 6363-53-7), cu o puritate de minimum 99 %.

4.6. Acetonitril pur (CAS 75-05-8) pentru analiza HPLC.

4.7. Apă distilată sau demineralizată, de preferat microfiltrată.

4.8. Solvenți (exemplu)

Solventul de eluare este compus din:

75 de părți (volume) de acetonitril (4.6),

25 de părți (volume) de apă distilată (4.7).

Se trece heliu prin solventul de eluare, într-un ritm lent, timp de 5-10 minute, înainte de a fi folosit pentru degazare.

Dacă apa utilizată nu a fost microfiltrată, solventul ar trebui să fie filtrat cu ajutorul unui filtru pentru solvenți organici cu diametrul porilor mai mic decât sau egal cu 0,45 μm.

4.9. Etanol absolut (CAS 64-17-5).

4.10. Soluție de etanol (5 %, v/v).

4.11. Pregătirea soluției-mamă standard (20g/l)

Se cântăresc 2 g din fiecare dintre zaharurile care urmează să fie analizate (4.1.-4.5.), se transferă cantitativ într-un balon volumetric de 100 ml. (NB: 2,11 g de maltoză monohidrată echivalează cu 2 g de maltoză).

Se ajustează la 100 ml cu o soluție de alcool de 5 % vol. (4.10), se agită și se păstrează la aproximativ + 4 °C. Se prepară o nouă soluție-mamă o dată pe săptămână.

4.12. Pregătirea soluțiilor standard de lucru (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 și 20,0 g/l)

Se diluează soluția-mamă, 20 g/l, (4.11) corespunzător cu o soluție de alcool de 5 % vol. (4.10) pentru a obține cinci soluții standard de lucru de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 și 20,0 g/l. Se filtrează cu un filtru având diametrul porilor mai mic decât sau egal cu 0,45 μm (5.3.).

5. Aparatură și echipamente

5.1. Sistem HPLC care poate asigura rezoluția liniei de bază pentru toate zaharurile.

5.1.1. Cromatograf lichid de înaltă performanță prevăzut cu valvă de injecție cu șase orificii, prevăzut cu o buclă de 10 μ L sau cu orice alt dispozitiv, automat sau manual, pentru injectarea fiabilă a microvolumelor.

5.1.2. Sistem de pompare care permite obținerea și menținerea unui debit constant sau programat de înaltă precizie.

5.1.3. Refractometru diferențial.

5.1.4. Integrator computerizat sau înregistrator ce funcționează în compatibilitate cu restul sistemului.

5.1.5. Precoloană:

Se recomandă atașarea unei precoloane adecvate la coloana analitică.

5.1.6. Coloană (exemplu):

Material: oțel inoxidabil sau sticlă.

Diametru interior: 2-5 mm.

Lungime: 100-250 mm (în funcție de dimensiunea particulei încărcate), de exemplu 250 mm dacă particula are diametrul de 5 μ m.

Fază staționară: grupele funcționale ale alchilamnei legate de siliciu, dimensiunea maximă a particulei de 5 μ m.

5.1.7. Condiții pentru cromatografie (exemplu):

Solvent de eluare (4.8.), debit: 1 ml/minut.

Detectare: Refractometrie diferențială.

Pentru a se asigura că detectorul este perfect stabil, acesta ar trebui să fie pornit cu câteva ore înainte de utilizare. Celula de referință trebuie să fie umplută cu solvent de eluare.

5.2. Balanța analitică cu o precizie de 0,1 mg.

5.3. Dispozitiv de filtrare pentru volume mici cu ajutorul unei micromembrane de 0,45 μ m.

6. Depozitarea probelor

La primire, probele trebuie depozitate la temperatura camerei înainte de analiză.

7. Mod de lucru

7.1. PARTEA A: Pregătirea probei

7.1.1. Se agită proba.

7.1.2. Se filtrează cu un filtru având diametrul porilor mai mic decât sau egal cu 0,45 μ m (5.3.).

7.2. PARTEA B: HPLC

7.2.1. Determinare

Se injectează 10 μ l din soluțiile standard (4.12.) și probe (7.1.2.). Se efectuează analiza în condiții cromatografice adecvate, cum ar fi cele descrise mai sus.

- 7.2.2. În cazul în care oricare vârf al unei probe are suprafața (sau înălțimea) mai mare decât vârful corespunzător în soluția standard cea mai concentrată, proba trebuie diluată cu apă distilată și reanalizată.

8. Calculare

Se compară cele două cromatograme obținute pentru soluția standard și pentru băutura spirtoasă. Se identifică vârfurile după timpul lor de retenție. Se măsoară suprafețele lor (sau înălțimile) pentru a se calcula concentrațiile prin metoda standard externă. Se iau în considerare toate diluțiile efectuate în timpul pregătirii probei.

Rezultatul final reprezintă suma zaharozei, maltozei, lactozei, glucozei și fructozei, exprimat ca zahăr invertit în g/l.

Zahărul invertit se calculează ca suma tuturor monozaharidelor și reducând dizaharidele prezente, plus cantitatea stoichiometrică de glucoză și fructoză calculată din zaharoza prezentă.

$$\text{Zahăr invertit (g/l)} = \text{glucoză (g/l)} + \text{fructoză (g/l)} + \text{maltoză (g/l)} + \text{lactoză (g/l)} + (\text{zaharoză (g/l)} \times 1,05)$$

$$1,05 = (\text{masa moleculară a fructozei} + \text{masa moleculară a glucozei}) / \text{masa moleculară a zaharozei}$$

9. Caracteristici de performanță ale metodei (precizia)

9.1. Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Următoarele date au fost obținute dintr-un studiu internațional de performanță a metodei efectuat cu proceduri acceptate la nivel internațional [1] [2].

Anul testului interlaboratoare 2000

Numărul de laboratoare 24

Numărul de probe 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.

Tabelul 1

Fructoză, glucoză, maltoză

Analit	Fructoză		Glucoză			Maltoză	
Probe (× 2)	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Băutură spirtoasă cu aromă de anason	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Băutură spirtoasă cu aromă de anason	Standard (10 g/l)
Valoarea medie [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	21	22	21	23	19	21	22
Deviația standard de repetabilitate, s _r [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analit	Fructoză		Glucoză			Maltoză	
Probe (× 2)	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Băutură spirtoasă cu aromă de anason	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Băutură spirtoasă cu aromă de anason	Standard (10 g/l)
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Limită de repetabilitate, r [g/l] ($r = 2,8 \times sr$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_r [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabelul 2

Zaharoză

Analit	Zaharoză					
Probe	Pastis	Ouzo	Lichior de cireșe	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (100 g/l)
Valoarea medie [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	19	19	20	18	18	18
Deviația standard de repetabilitate, s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Limită de repetabilitate, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) nivel de ramificare

Tabelul 3

Zaharuri totale

(Notă: aceste date au fost calculate pentru zaharurile totale și nu pentru zahăr invertit astfel cum este definit la punctul 8 de mai sus.)

Probe	Pastis	Ouzo	Băutură spirtoasă cu aromă de anason	Lichior de cireșe	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (220 g/l)
Valoarea medie [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	20	19	20	20	18	18	19
Deviația standard de repetabilitate, s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Limită de repetabilitate, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) nivel de ramificare"

4. Se introduce următorul capitol X:

„X. **DETERMINAREA URMĂTORILOR COMPUȘI DIN LEMN ÎN BĂUTURILE SPIRTOASE PRIN METODA CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC): FURFURAL, 5-HIDROXIMETILFURFURAL, 5-METILFURFURAL, VANILINĂ, ALDEHIDĂ SIRINGICĂ, ALDEHIDĂ CONIFERICĂ, SINAPALDEHIDĂ, ACID GALIC, ACID ELAGIC, ACID VANILIC, ACID SIRINGIC ȘI SCOPOLETINĂ**

1. Domeniu de aplicare

Metoda se referă la determinarea compușilor: furfural, 5-hidroximetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilină, aldehydă siringică, aldehydă coniferică, sinapaldehidă, acid galic, acid elagic, acid vanilic, acid siringic și scopoletină prin cromatografia lichidă de înaltă performanță.

2. Referință normativă

Metodă analitică recunoscută de Adunarea Generală a Organizației Internaționale a Viei și Vinului (OIV) și publicată de OIV cu numărul de referință OIV-MA-BS-16: R2009.

3. Principiu

Determinarea prin cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), cu detectare prin spectrofotometria în ultraviolet la mai multe lungimi de undă și prin spectrofluorimetrie.

4. Reactivi

Reactivii trebuie să fie de calitate analitică. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau apă de o puritate cel puțin echivalentă. Este de preferat să se utilizeze apă microfiltrată cu o rezistivitate de 18,2 M Ω .cm.

4.1. Alcool de 96 % vol.

4.2. Metanol de calitate HPLC (Solvent B).

4.3. Acid acetic diluat la 0,5 % vol. (Solvent A).

4.4. Faze mobile: (dat numai ca exemplu).

Solvent A (0,5 % acid acetic) și solvent B (metanol pur). Se filtrează printr-o membrană (cu porozitate 0,45 μ m). Dacă este necesar, se degazează într-o baie cu ultrasunete.

4.5. Soluție standard de referință cu puritate minimă 99 %: furfural, 5-hidroximetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilină, aldehydă siringică, aldehydă coniferilică, sinapaldehydă, acid galic, acid elagic, acid vanilic, acid siringic și scopoletină.

4.6. Soluție de referință: substanțele standard se dizolvă într-o soluție apă-alcool de 50 % vol. Concentrațiile finale în soluția de referință trebuie să fie de ordinul a:

furfural: 5 mg/l; 5-hidroximetilfurfural: 10 mg/l; 5-metilfurfural 2 mg/l; vanilină: 5 mg/l; aldehydă siringică: 10 mg/l; aldehydă coniferilică: 5 mg/l; sinapaldehydă: 5 mg/l; acid galic: 10 mg/l; acid elagic: 10 mg/l; acid vanilic: 5 mg/l; acid siringic: 5 mg/l; scopoletină: 0,5 mg/l.

5. Aparatură

Aparatură standard de laborator

5.1. Un cromatograf lichid de înaltă performanță capabil să funcționeze în mod gradient binar și echipat cu:

5.1.1. Un detector spectrofotometric capabil să măsoare la lungimi de undă de la 260 până la 340 nm. Cu toate acestea, este de preferat să se lucreze cu un detector cu multiple lungimi de undă cu rețea de diode, pentru a confirma puritatea vârfurilor.

5.1.2. Un detector spectrofluorimetric – lungime de undă de excitare: 354 nm, lungime de undă de emisie: 446 nm (pentru determinarea urmelor de scopoletină; care este detectabilă, de asemenea, la 313 nm cu ajutorul spectrofotometriei).

5.1.3. Un dispozitiv de injectare care poate introduce 10 sau 20 μ l (de exemplu) din proba de testare.

5.1.4. O coloană pentru cromatografie lichidă de înaltă performanță, de tip RP C18, cu dimensiunea maximă a particulei de 5 μ m.

5.2. Seringi pentru HPLC.

5.3. Dispozitiv pentru filtrare prin membrană a volumelor mici.

5.4. Integrator computerizat sau înregistrator care funcționează în compatibilitate cu întreaga aparatură și, în special, care trebuie să aibă mai multe canale de achiziție.

6. Mod de lucru

6.1. Pregătirea soluției care urmează a fi injectată

Soluția de referință și băutura spirtoasă se filtrează, dacă este necesar, printr-o membrană cu diametrul maxim al porilor de 0,45 μ m.

- 6.2. Condiții de operare cromatografică: analiza se efectuează la temperatura ambiantă cu ajutorul echipamentului descris la punctul (5.1) și folosind fazele mobile (4.4), cu un debit de aproximativ 0,6 ml pe minut și urmărind gradientul de mai jos (dat numai ca exemplu)

Time: 0 min 50 min 70 min 90 min

solvent A (apă-acid): 100 % 60 % 100 % 100 %

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

Trebuie remarcat că, în anumite cazuri, acest gradient ar trebui modificat pentru a se evita co-eluările.

6.3. Determinare

- 6.3.1. Se injectează soluțiile standard de referință separat, apoi amestecate.

Se adaptează condițiile de operare astfel încât factorii de rezoluție ai vârfurilor tuturor compușilor să fie egali cu cel puțin 1.

- 6.3.2. Se injectează proba preparată conform punctului 6.1.

- 6.3.3. Se măsoară suprafața vârfurilor în soluția de referință și băutura spirtoasă și se calculează concentrațiile.

7. Exprimarea rezultatelor

Se exprimă concentrația fiecărui constituent în mg/l.

8. Caracteristici de performanță ale metodei (precizia)

Următoarele date au fost obținute în 2009 dintr-un studiu internațional de performanță a metodei, efectuat cu proceduri acceptate la nivel internațional [1], [2].

8.1. Furfural

Analit	Furfural					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	15	15	15	15	15	15
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	14	12	13	14	13	13
Valoarea medie [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analit	Furfural					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Deviația standard de reproducibilitate, s_R [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Deviația standard relativă de reproducibilitate, RSD_r [%]	8	15	5	13	3	5
Limita de reproducibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-Hidroximetilfurfural

Analit	5-Hidroximetilfurfural					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	16	16	16	16	16	16
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	14	14	14	14	14	14
Valoarea medie [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Deviația standard de reproducibilitate, s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Deviația standard relativă de reproducibilitate, RSD_r [%]	8	9	5	13	7	9
Limita de reproducibilitate, 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					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	11	11	11	11	11	11
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	11	11	8	11	10	11
Valoarea medie [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_r [%]	35	18	22	39	12	35
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanilină

Analit	Vanilină					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	16	15	16	16	16	16
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	16	15	16	16	16	16
Valoarea medie [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analit	Vanilină					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_r [%]	19	25	15	22	13	16
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Aldehidă siringică

Analit	Aldehidă siringică					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	16	15	16	16	16	16
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	13	13	13	12	14	13
Valoarea medie [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Aldehidă coniferică

Analit	Aldehidă coniferică					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	13	12	13	12	13	13
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	12	12	13	12	13	13
Valoarea medie [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinapaldehidă

Analit	Sinapaldehidă					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	14	14	14	14	15	14
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	14	13	12	13	13	12
Valoarea medie [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analit	Sinapaldehidă					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Acid galic

Analit	Acid galic					
Probă	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	16	15	16	16	16	16
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	15	14	16	16	16	16
Valoarea medie [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Acid elagic

Analit	Acid elagic					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	7	7	7	7	7	7
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	7	7	7	7	7	6
Valoarea medie [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Acid vanilic

Analit	Acid vanilic					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	15	15	15	15	15	15
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	12	11	14	14	15	14
Valoarea medie [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analit	Acid vanilic					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Acid siringic

Analit	Acid siringic					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	16	15	16	16	16	16
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	16	15	15	15	16	15
Valoarea medie [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Limita de reproductibilitate, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Scopoletină

Analit	Scopoletină					
Probe	Whisky	Brandy	Rom	Coniac 1	Bourbon	Coniac 2
Numărul de laboratoare participante	10	10	10	10	10	10
Numărul de rezultate acceptate (laboratoare)	9	8	9	8	8	8
Valoarea medie [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Deviația standard de repetabilitate, s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Deviația standard relativă de repetabilitate, RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Limită de repetabilitate, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Deviația standard de reproductibilitate, s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Deviația standard relativă de reproductibilitate, RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Limita de reproductibilitate, 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.”