

## II

(Nelegislatívne akty)

## NARIADENIA

## VYKONÁVACIE NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2016/635

z 22. apríla 2016,

ktorým sa mení príloha k nariadeniu (ES) č. 2870/2000, pokiaľ ide o určité referenčné metódy analýzy liehovín

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 z 15. januára 2008 o definovaní, popise, prezentácii, označovaní a ochrane zemepisných označení liehovín a o zrušení nariadenia (EHS) č. 1576/89 <sup>(1)</sup>, a najmä na jeho článok 28 ods. 2,

keďže:

- (1) V nariadení Komisie (ES) č. 2870/2000 <sup>(2)</sup> je uvedený zoznam a opis referenčných metód analýzy liehovín. Niektoré z metód v prílohe k uvedenému nariadeniu, medzi inými metódy stanovenia koncentrácie prchavých kyselín a celkového obsahu cukrov v liehovinách, však doposiaľ neboli opísané.
- (2) Metódy stanovenia koncentrácie prchavých kyselín a celkového obsahu cukrov v určitých liehovinách boli predmetom dvoch medzinárodných validačných štúdií, ktoré boli vykonané v súlade s medzinárodne dohodnutými postupmi, pričom výkonnostné parametre týchto metód boli uznané za prijateľné. Štúdie boli vykonané ako súčasť výskumného projektu v rámci IV. rámcového programu meracích a testovacích noriem (MTN) Európskej komisie. Opis týchto metód by sa preto mal zahrnúť do prílohy k nariadeniu (ES) č. 2870/2000.
- (3) Nariadením (ES) č. 110/2008 sa stanovujú požiadavky na niektoré kategórie liehovín, ktoré dozrievajú v drevených sudoch a umožňuje takéto dozrievanie aj v prípade iných liehovín. Analýza hlavných zložiek pochádzajúcich z dreva môže pomôcť pri zväžení skutočnosti, či je vzorka v súlade s definíciou zodpovedajúcou príslušnej kategórii liehoviny. Medzinárodná organizácia pre vinič a víno (OIV) uznala analytickú metódu na stanovenie týchto zložiek vo svojom uznesení OIV/OENO 382A/2009. Uznatie tejto metódy je založené na údajoch získaných z medzinárodnej štúdie výkonnosti metódy v prípade rôznych liehovín vykonanej na základe medzinárodne dohodnutých postupov. Táto metóda a jej opis by sa preto mali doplniť do referenčných metód Únie na analýzu liehovín uvedených v prílohe k nariadeniu (ES) č. 2870/2000.
- (4) Nariadenie (ES) č. 2870/2000 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť.
- (5) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Výboru pre liehoviny,

<sup>(1)</sup> Ú. v. EÚ L 39, 13.2.2008, s. 16.

<sup>(2)</sup> Nariadenie Komisie (ES) č. 2870/2000 z 19. decembra 2000, ktorým sa stanovujú referenčné metódy analýzy liehovín v Spoločenstve (Ú. v. ES L 333, 29.12.2000, s. 20).

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

*Článok 1*

Príloha k nariadeniu (ES) č. 2870/2000 sa mení v súlade s prílohou k tomuto nariadeniu.

*Článok 2*

Toto nariadenie nadobúda účinnosť tretím dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 22. apríla 2016

*Za Komisiu*  
*predseda*  
Jean-Claude JUNCKER

## PRÍLOHA

Príloha k nariadeniu (ES) č. 2870/2000 sa mení takto:

1. Obsah sa mení takto:

a) v bodoch III. 3 a VIII sa termín „(p.m.)“ vypúšťa;

b) dopĺňa sa tento bod:

„X. Stanovenie zložiek dreva: furfural, 5-(hydroxymetyl)furfural, 5-metylfurfural, vanilín, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, kyselina galová, kyselina elagová, kyselina vanilová, syringová a skopoletín.“

2. Do kapitoly III sa dopĺňa táto časť:

„III.3. STANOVENIE KONCENTRÁCIE PRCHAVÝCH KYSELÍN V LIEHOVINÁCH

1. **Zameranie**

Táto metóda bola validovaná medzilaboratórnou štúdiou rumu, brandy, destilátov z výliskov a ovocia na úrovniach v rozsahu od 30 mg/l do 641 mg/l.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987: Kvalita vody na analytické účely. Špecifikácia a skúšobné metódy.

3. **Definície**

3.1. Koncentrácia prchavých kyselín sa vypočíta odčítaním koncentrácie neprchavých kyselín od celkovej kyslosti.

3.2. Celková kyslosť je súčtom titrovateľných kyselín.

3.3. Koncentrácia neprchavých kyselín je daná kyslosťou zvyšku, ktorý zostane po odparení liehoviny do sucha.

4. **Princíp**

Celková kyslosť a koncentrácia neprchavých kyselín sa stanovujú titráciou alebo potenciometriou.

5. **Reagenty a materiály**

Pokiaľ nie je uvedené inak, pri rozbere sa používajú iba reagenty uznávanej analytickej kvality a voda najmenej stupňa 3 podľa normy ISO 3696:1987.

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

5.2. Roztok zmesného indikátora:

Odvážte 0,1 g indigokarmínu a 0,1 g fenolovej červene.

Rozpusťte v 40 ml vody a doplňte etanolom na 100 ml.

6. **Prístroje a vybavenie**

Nepriame laboratórne prístroje, laboratórne sklo triedy A a tieto pomôcky:

6.1. vodné čerpadlo

- 6.2. rotačná vákuová odparka alebo ultrazvukový kúpeľ
- 6.3. vybavenie na potenciometrickú titráciu (nepovinné)

## 7. Odber vzoriek a vzorky

Vzorky sa pred analýzou skladujú pri izbovej teplote.

## 8. Postup

### 8.1. Celková kyslosť

#### 8.1.1. Príprava vzorky

Liehovina sa ožiari ultrazvukom alebo mieša dve minúty vo vákuu s cieľom zbaviť ju v prípade potreby oxidu uhličitého.

#### 8.1.2. Titrácia

Do 500 ml Erlenmeyerovej banky napipetujte 25 ml liehoviny.

Pridajte asi 200 ml vychladenej prevarenej destilovanej vody (denne čerstvo pripravenej) a 2 – 6 kvapiek zmesného indikátorového roztoku (5.2).

Titrujte s 0,01 M roztoku hydroxidu sodného (5.1), kým sa žltozelené sfarbenie zmení na fialové (ak ide o bezfarebné liehoviny), príp. žltohnedé sfarbenie na červenohnedé (ak ide o liehoviny hnedej farby).

Titráciu možno vykonať aj potenciometriou na pH 7,5.

Objem  $n_1$  ml je objemom pridaného 0,01 M roztoku hydroxidu sodného.

#### 8.1.3. Výpočet

Celková kyslosť (*total acidity* – TA) vyjadrená v miliekvivalentoch na liter liehoviny sa rovná  $0,4 \times n_1$ .

Celková kyslosť (TA') vyjadrená v miligramoch kyseliny octovej na liter liehoviny sa rovná  $24 \times n_1$ .

### 8.2. Koncentrácia neprchavých kyselín

#### 8.2.1. Príprava vzorky

Odperte 25 ml liehoviny do sucha:

napipetujte 25 ml liehoviny do cylindrickej odparovacej nádoby s rovným dnom s priemerom 55 mm. Počas prvej hodiny odparovania je odparovacia nádoba položená na veku kúpeľa s vriacou vodou tak, aby kvapalina nevrela, pretože by to mohlo viesť k stratám vyšpliechaním.

Dokončíte sušenie vložení odparovacej nádoby do sušiacej piecky s teplotou 105 °C na dve hodiny. Odparovaciu nádobu nechajte vychladnúť v exsikátore.

#### 8.2.2. Titrácia

Rozpustíte zvyšok, ktorý zostal po vyparení, spolu s vychladenou prevarenou destilovanou vodou (denne čerstvo pripravenu), doplňte na objem približne 100 ml a pridajte 2 – 6 kvapiek zmesného indikátorového roztoku (5.2).

Titrujte s 0,01 M roztoku hydroxidu sodného (5.1):

Titraciu možno vykonať aj potenciometriou na pH 7,5.

Objem  $n_2$  ml je objemom pridaného 0,01 M roztoku hydroxidu sodného.

### 8.2.3. Výpočet

Koncentrácia neprchavých kyselín (*fixed acidity* – FA) vyjadrená v miliekvivalentoch na liter liehoviny sa rovná  $0,4 \times n_2$ .

Koncentrácia neprchavých kyselín (FA') vyjadrená v miligramoch kyseliny octovej na liter liehoviny sa rovná  $24 \times n_2$ .

## 9. Výpočet koncentrácie prchavých kyselín

### 9.1. Vyjadrenie v miliekvivalentoch na liter:

kde:

TA = je celková kyslosť v miliekvivalentoch na liter

FA = je koncentrácia neprchavých kyselín v miliekvivalentoch na liter

Koncentrácia prchavých kyselín (*volatile acidity* – VA) v miliekvivalentoch na liter sa rovná:

$$TA - FA$$

### 9.2. Vyjadrenie v mg kyseliny octovej na liter:

Ak je:

TA' = celková kyslosť v miligramoch kyseliny octovej na liter

FA' = koncentrácia neprchavých kyselín v miligramoch kyseliny octovej na liter

Koncentrácia prchavých kyselín (VA) v miligramoch kyseliny octovej na liter sa rovná:

$$TA' - FA'$$

### 9.3. Vyjadrenie v gramoch kyseliny octovej na hektoliter čistého 100 % alkoholu sa rovná: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

kde A je obsah etanolu na objem liehoviny.

## 10. Pracovné charakteristiky metódy (presnosť)

### 10.1. Štatistické výsledky medzilaboratórnej porovnávacej skúšky

Ďalej uvedené údaje boli získané z medzinárodnej porovnávacej štúdie metódy, ktorá sa uskutočnila podľa medzinárodne odsúhlasených postupov [1], [2].

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávacej skúšky	2000
Počet laboratórií	18
Počet vzoriek	6

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet laboratórií, ktoré zostali po vylúčení tých, v ktorých sa namerali odľahlé hodnoty	16	18	18	14	18	18
Počet laboratórií s odľahlými hodnotami	2			4		
Počet akceptovaných výsledkov	32	36	36	28	36	36
Stredná hodnota ( $\bar{x}$ ) [v mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_p$ [v mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti RSD <sub>r</sub> [v %]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Limit opakovateľnosti r [v mg/l]	23	10	42	10	19	24
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti RSD <sub>R</sub> [v %]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Limit reprodukovateľnosti R [v mg/l]	24	23	70	13	38	68

Typy vzoriek:

- A slivka; rozdelená úroveň\*
- B rum I; slepé duplikáty
- C rum II; rozdelená úroveň\*
- D slivovica; slepé duplikáty
- E brandy; slepé duplikáty
- F destilát z výliskov; slepé duplikáty

[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. Vkladá sa táto kapitola VIII:

#### „VIII. CELKOVÝ OBSAH CUKROV

##### 1. Zameranie

Na stanovenie celkového obsahu cukrov (vyjadrený ako invertný cukor) v liehovinách, s výnimkou likérov obsahujúcich vajcia a mliečne výrobky, sa používa metóda HPLC-RI.

Metóda bola validovaná medzilaboratórnou štúdiou likéru pastis, destilovaného anízu, čerešňového likéru a krémového likéru z (nasleduje názov použitého ovocia alebo použitej suroviny), krémového likéru z čiernych ríbezlí na úrovniach v rozsahu od 10,86 g/l do 509,7 g/l. Lineárnosť odozvy prístroja však bola dokázaná v prípade rozsahu koncentrácie od 2,5 g/l do 20,0 g/l.

Táto metóda nie je určená na stanovenie nízkych úrovní obsahu cukrov.

## 2. Odkazy na normy

ISO 3696:1987: Kvalita vody na analytické účely. Špecifikácia a skúšobné metódy.

## 3. Princíp

Vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou sa analyzujú roztoky cukru s cieľom stanoviť koncentrácie glukózy, fruktózy, sacharózy, maltózy a laktózy v nich.

Táto metóda využíva alkylamínovú stacionárnu fázu a diferenciálnu refraktometriu a uvádza sa ako príklad. Možné by malo byť aj použitie meniča aniónov ako stacionárnej fázy.

## 4. Reagenty a materiály

- 4.1. Glukóza (CAS č. 50-99-7) s čistotou najmenej 99 %.
- 4.2. Fruktóza (CAS č. 57-48-7) s čistotou najmenej 99 %.
- 4.3. Sacharóza (CAS č. 57-50-1) s čistotou najmenej 99 %.
- 4.4. Laktóza (CAS č. 5965-66-2) s čistotou najmenej 99 %.
- 4.5. Maltóza, monohydrát (CAS č. 6363-53-7) s čistotou najmenej 99 %.
- 4.6. Čistý acetonitril (CAS 75-05-8) na analýzu HPLC.
- 4.7. Destilovaná alebo demineralizovaná voda, najlepšie mikrofiltrovaná.

### 4.8. Rozpúšťadlá (príklad)

Elučné rozpúšťadlo je zložené:

zo 75 objemových častí acetonitrilu (4.6),

z 25 objemových častí acetonitrilu (4.7).

Pred odplynením nechajte 5 až 10 minút prúdiť hélium malým prietokom.

Ak použitá voda nebola mikrofiltrovaná, rozpúšťadlo by sa malo filtrovať filtrom na organické rozpúšťadlá s veľkosťou pórov  $\leq 0,45 \mu\text{m}$ .

- 4.9. Absolútny etanol (CAS 64-17-5).
- 4.10. Roztok etanolu (5 % obj.).
- 4.11. Príprava zásobného štandardného roztoku (20 g/l)

Odvážte 2 g z každého cukru, ktorý sa má analyzovať (4.1. až 4.5.), a preneste ich bez straty do 100 ml odmernej banky. (pozn.: 2,11 g monohydrátu maltózy zodpovedá 2 g maltózy).

Doplňte do 100 ml roztokom 5 % obj. etanolu (4.10), pretrepte a skladujte pri teplote okolo + 4 °C. Nový zásobný roztok pripravujte raz týždenne.

### 4.12. Príprava pracovných štandardných roztokov (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 a 20,0 g/l)

Zásobný roztok 20g/l (4.11) zriedte v roztoku 5 % obj. etanolu (4.10), aby ste získali päť pracovných štandardných roztokov 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 a 20,0 g/l. Filtrujte filtrom s veľkosťou pórov  $\leq 0,45 \mu\text{m}$  (5.3).

## 5. Prístroje a vybavenie

5.1. HPLC systém umožňujúci dosiahnuť úplné rozlíšenie všetkých cukrov.

5.1.1. Vysokoúčinný kvapalinový chromatograf so šesťcestným vstrekovacím ventilom vybavený 10 µl slučkou alebo akýmkoľvek iným zariadením, automatickým či manuálnym, umožňujúci spoľahlivé vstrekovanie mikroobjemov.

5.1.2. Čerpací systém umožňujúci dosiahnuť a udržiavať konštantnú alebo naprogramovanú rýchlosť prietoku s veľkou presnosťou.

5.1.3. Diferenciálny refraktometer.

5.1.4. Počítačový integrátor alebo zapisovač, ktorého výkon je kompatibilný so zvyškom zostavy.

5.1.5. Predkolóna:

odporúča sa spojiť analytickú kolónu s vhodnou predkolónou.

5.1.6. Kolóna (príklad):

Materiál: nehrdzavejúca oceľ alebo sklo.

Vnútorň priemer: 2 až 5 mm.

Dĺžka: 100 až 250 mm (v závislosti od veľkosti častíc v balení), napríklad 250 mm v prípade častíc s priemerom 5 µm.

Stacionárna fáza: alkylamínové funkčné skupiny viazané na oxid kremičitý s maximálnou veľkosťou častíc 5 µm.

5.1.7. Chromatografické podmienky (príklad).

Elučné rozpúšťadlo (4.8.), prietoková rýchlosť: 1 ml/min.

Detekcia: diferenciálnym refraktometrom.

Aby ste sa uistili, že je detektor dokonale stabilný, mali by ste ho zapnúť niekoľko hodín pred použitím. Referenčná kvjeta sa musí naplniť elučným rozpúšťadlom.

5.2. Analytické váhy s presnosťou na 0,1 mg.

5.3. Filtračná zostava pre malé objemy s použitím 0,45 µm mikromembrány.

## 6. Skladovanie vzoriek

Po doručení sa vzorky pred analýzou skladujú pri izbovej teplote.

## 7. Postup

7.1. ČASŤ A: Príprava vzorky

7.1.1. Vzorku pretrepte.

7.1.2. Vzorku filtrujte filtrom s veľkosťou pórov ≤ 0,45 µm (5.3).

7.2. ČASŤ B: HPLC

7.2.1. Stanovenie

Nadávkujte 10 µl štandardných roztokov (4.12.) a vzoriek (7.1.2.). Analyzujte za vhodných chromatografických podmienok, napr. tých, ktoré sú opísané vyššie.



- 7.2.2. Ak by niektorý z píkov dosiahol väčšiu plochu (alebo výšku) ako zodpovedajúci pík štandardného roztoku s najvyššou koncentráciou, mala by sa vzorka zriediť destilovanou vodou a znovu analyzovať.

## 8. Výpočet

Porovnajete dva chromatogramy – jeden zo štandardného roztoku a jeden z liehoviny. Identifikujte píky podľa ich retenčných časov. Zmerajte ich plochy (alebo výšky) na výpočet koncentrácie metódou externého štandardu. Zohľadnite každé zriedenie vzorky.

Konečným výsledkom je suma sacharózy, maltózy, laktózy, glukózy a fruktózy vyjadrená ako invertný cukor v gramoch/L.

Invertný cukor sa vypočíta ako suma všetkých prítomných monosacharidov a redukujúcich disacharidov plus stechiometrické množstvo glukózy a fruktózy vypočítané z prítomnej sacharózy.

$$\begin{aligned} \text{Invertný cukor (g/l)} &= \text{glukóza (g/l)} + \text{fruktóza (g/l)} + \text{maltóza (g/l)} + \text{laktóza (g/l)} + (\text{sacharóza (g/l)} \times 1,05) \\ 1,05 &= (\text{molekulová hmotnosť fruktózy} + \text{molekulová hmotnosť glukózy}) / \text{molekulová hmotnosť sacharózy} \end{aligned}$$

## 9. Pracovné charakteristiky metódy (presnosť)

### 9.1. Štatistické výsledky medzilaboratórnej porovnávej skúšky

Ďalej uvedené údaje boli získané z medzinárodnej porovnávej štúdie metódy, ktorá bola vypracovaná podľa medzinárodne odsúhlasených postupov [1], [2].

Rok vykonania medzilaboratórnej porovnávej skúšky	2000
Počet laboratórií	24
Počet vzoriek	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'.

Tabuľka 1

### Fruktóza, glukóza, maltóza

Analyt	Fruktóza		Glukóza			Maltóza	
	Krémový likér z čiernych ríbezlí	Štandard (50 g/l)	Liehoviny s anízovou príchuťou	Krémový likér z čiernych ríbezlí	Štandard (50 g/l)	Liehoviny s anízovou príchuťou	Štandard (10 g/l)
Stredná hodnota [v g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Počet laboratórií bez odľahlých hodnôt	21	22	21	23	19	21	22
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analyt	Fruktóza		Glukóza			Maltóza	
	Krémový likér z čiernych ríbezlí	Štandard (50 g/l)	Liehoviny s anízovou príchuťou	Krémový likér z čiernych ríbezlí	Štandard (50 g/l)	Liehoviny s anízovou príchuťou	Štandard (10 g/l)
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Limit opakovateľnosti $r$ [v g/l] ( $r = 2,8 \times sr$ )	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times sR$ )	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabuľka 2

## Sacharóza

Analyt	Sacharóza					
	Pastis	Ouzo	Čerešňový likér	Krémový likér z máty	Krémový likér z čiernych ríbezlí	Štandard (100 g/l)
Stredná hodnota [v g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Počet laboratórií bez odľahlých hodnôt	19	19	20	18	18	18
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Limit opakovateľnosti $r$ [v g/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(\*) ako rozdelené úrovne

Tabuľka 3

**Celkový obsah cukrov**

(Poznámka: tieto údaje boli vypočítané pre celkový obsah cukrov, nie pre invertný cukor podľa oddielu 8.)

Vzorky	Pastis	Ouzo	Liehoviny s anízovou príchuťou	Čerešňový likér	Krémový likér z mäty	Krémový likér z čiernych ríbezlí	Štandard (220 g/l)
Stredná hodnota [v g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Počet laboratórií bez odľahých hodnôt	20	19	20	20	18	18	19
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Limit opakovateľnosti $r$ [v g/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(\*) ako rozdelené úrovne“

## 4. Dopĺňa sa táto kapitola X:

„X. **STANOVENIE TÝCHTO ZLOŽIEK DREVA V LIEHOVINÁCH VYSOKOÚČINNOU KVAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIU (HPLC): FURFURAL, 5-(HYDROXYMETYL)FURFURAL, 5-METYLFURFURL, VANILÍN, SYRINGALDEHYD, KONIFERALDEHYD, SINAPALDEHYD, KYSELINA GALOVÁ, KYSELINA ELAGOVÁ, KYSELINA VANILOVÁ, KYSELINA SYRINGOVÁ A SKOPOLETÍN**

1. **Zameranie**

Táto metóda je vhodná na stanovenie furfuralu, 5-(hydroxymetyl)furfuralu, 5-metylfurfuralu, vanilínu, syringaldehydu, koniferaldehydu, sinapaldehydu, kyseliny galovej, kyselina elagovej, kyseliny vanilovej, kyseliny syringovej a skopoletínu vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

2. **Odkazy na normy**

Analytická metóda uznaná Valným zhromaždením Medzinárodnej organizácie pre vinič a víno (OIV) a uverejnená OIV pod referenčným číslom OIV-MA-BS-16: R2009.

3. **Princíp**

Stanovenie pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s detekciou ultrafialovou spektrometriou pri rôznych vlnových dĺžkach a spektrofluorimetriou.

#### 4. Reagenty

Všetky reagenty musia byť analyticky čisté. Voda musí byť destilovaná alebo aspoň ekvivalentnej čistoty. Vhodnejšie je používať mikrofiltrovanú vodu s odporom 18,2 M  $\Omega$ .cm.

- 4.1. 96 % obj. etanolu.
- 4.2. Metanol HPLC kvality (rozpúšťadlo B).
- 4.3. Kyselina octová zriedená na 0,5 % obj. (rozpúšťadlo A).
- 4.4. Mobilné fázy: (uvádzané len ako príklad).

Rozpúšťadlo A (0,5 % kyselina octová) a rozpúšťadlo B (čistý metanol). Prefiltrujte cez membránu (pórovitosť 0,45  $\mu$ m). V prípade potreby odplyňte v ultrazvukovom kúpeli.

- 4.5. Referenčné štandardy minimálnej čistoty 99 %: furfural, 5-(hydroxymetyl)furfural, 5-metylfurfural, vanilín, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, kyselina galová, kyselina elagová, kyselina vanilová, kyselina syringová a skopoletín.
- 4.6. Referenčný roztok: štandardné látky sa rozpustia v 50 % obj. roztoku vody a etanolu. Konečné koncentrácie v referenčnom roztoku by mali byť v poradí:

furfural: 5 mg/l; 5-(hydroxymetyl)furfural: 10 mg/l; 5-metylfurfural 2 mg/l; vanilín 5 mg/l; syringaldehyd: 10 mg/l; koniferaldehyd: 5 mg/l; sinapaldehyd: 5 mg/l; kyselina galová: 10 mg/L; kyselina elagová: 10 mg/l; kyselina vanilová: 5 mg/L; kyselina syringová: 5 mg/L; skopoletín: 0,5 mg/L.

#### 5. Prístroje

Bežné laboratórne prístroje.

- 5.1. Vysokoúčinný kvapalinový chromatograf, ktorý je schopný prevádzky v režime s binárnym gradientom a je vybavený:
  - 5.1.1. spektrometrickým detektorom schopným merať pri vlnových dĺžkach od 260 do 340 nm. Vhodnejšie je však pracovať s detektorom s diódovým poľom pre viacero vlnových dĺžok alebo podobným, aby bolo možné potvrdiť čistotu píkov.
  - 5.1.2. Spektrofluorimetrický detektor – vlnová dĺžka excitácie: 354 nm, emisná vlnová dĺžka: 446 nm (na stopovú analýzu skopoletínu, ktorá je možná aj spektrometriou pri 313 nm).
  - 5.1.3. Dávkovacie zariadenie schopné aplikovať 10 alebo 20  $\mu$ l (napríklad testovanej vzorky).
  - 5.1.4. Kolóna s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou, typ RP C18, maximálna veľkosť častíc 5  $\mu$ m.
- 5.2. Injekčné striekačky pre HPLC.
- 5.3. Zariadenie na membránovú filtráciu malých objemov.
- 5.4. Počítačový integrátor alebo zapisovač, ktorého výkon je kompatibilný s celým prístrojovým vybavením, a ktorý má hlavne viacero snímacích kanálov.

#### 6. Postup

- 6.1. Príprava dávkovacieho roztoku

Referenčný roztok a liehovina sa v prípade potreby prefiltrujú cez membránu s maximálnym priemerom pórov 0,45  $\mu$ m.

- 6.2. Prevádzkové podmienky chromatografie: vykonajte analýzu pri teplote okolitého prostredia pomocou prístrojov opísaných v bode 5.1 a použitím mobilnej fázy (4.4) s prietokom približne 0,6 ml za minútu podľa uvedeného gradientu (uvádzaného len ako príklad)

Čas: 0 min. 50 min. 70 min. 90 min.

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

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

Nezabudnite, že v určitých prípadoch by sa mal tento gradient upraviť, aby sa predišlo koelúciám.

### 6.3. Stanovenie

- 6.3.1. Nadávkujte po jednom referenčné štandardy a potom zmiešajte.

Prispôbte prevádzkové podmienky tak, aby sa rozlišovacie faktory píkov všetkých zložiek rovnali najmenej 1.

- 6.3.2. Nadávkujte vzorku pripravenú podľa bodu 6.1.

- 6.3.3. Zmerajte plochu pík v referenčnom roztoku a v liehovine a vypočítajte koncentrácie.

## 7. Vyjadrenie výsledkov

Koncentráciu každej zložky vyjadrite v mg/l.

## 8. Pracovné charakteristiky metódy (presnosť)

Tieto údaje boli získané z medzinárodnej štúdie spoľahlivosti metód na rozličných liehovinách z roku 2009, vykonanej podľa medzinárodne odsúhlasených postupov [1], [2].

### 8.1. Furfural

Analyt	Furfural					
	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	15	15	15	15	15	15
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	14	12	13	14	13	13
Stredná hodnota [v mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analyt	Furfural						
	Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_r$ [v mg/l]		0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]		8	15	5	13	3	5
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

## 8.2. 5-(hydroxymetyl)furfural

Analyt	5-(hydroxymetyl)furfural						
	Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií		16	16	16	16	16	16
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)		14	14	14	14	14	14
Stredná hodnota [v mg/l]		5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]		0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]		1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]		0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]		8	9	5	13	7	9
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

## 8.3. 5-metylfurfural

Analyt	5-metylfurfural					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	11	11	11	11	11	11
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	11	11	8	11	10	11
Stredná hodnota [v mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	35	18	22	39	12	35
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

## 8.4. Vanilín

Analyt	Vanilín					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	16	15	16	16	16	16
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	16	15	16	16	16	16
Stredná hodnota [v mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analyt	Vanilín						
	Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]		6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]		0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]		19	25	15	22	13	16
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

## 8.5. Syringaldehyd

Analyt	Syringaldehyd						
	Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií		16	15	16	16	16	16
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)		13	13	13	12	14	13
Stredná hodnota [v mg/l]		1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]		0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]		2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]		0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]		8	33	5	6	4	4
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2



## 8.6. Koniferaldehyd

Analyt	Koniferaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	13	12	13	12	13	13
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	12	12	13	12	13	13
Stredná hodnota [v mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	23	27	21	23	8	19
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

## 8.7. Sinapaldehyd

Analyt	Sinapaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	14	14	14	14	15	14
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	14	13	12	13	13	12
Stredná hodnota [v mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analyt	Sinapaldehyd					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	31	27	46	13	10	73
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

## 8.8. Kyselina galová

Analyt	Kyselina galová					
Vzorka	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	16	15	16	16	16	16
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	15	14	16	16	16	16
Stredná hodnota [v mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	36	47	31	53	30	35
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

## 8.9. Kyselina elagová

Analyt	Kyselina elagová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	7	7	7	7	7	7
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	7	7	7	7	7	6
Stredná hodnota [v mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	44	43	42	39	39	40
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	4,0	1,2	11	14	14	40

## 8.10. Kyselina vanilová

Analyt	Kyselina vanilová					
Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	15	15	15	15	15	15
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	12	11	14	14	15	14
Stredná hodnota [v mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analyt	Kyselina vanilová						
	Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]		14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]		0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]		28	20	35	31	51	26
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

## 8.11. Kyselina syringová

Analyt	Kyselina syringová						
	Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií		16	15	16	16	16	16
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)		16	15	15	15	16	15
Stredná hodnota [v mg/l]		0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]		0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]		6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]		0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]		19	29	11	18	13	14
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

## 8.1.2. Skopoletín

Analyt	Skopoletín						
	Vzorky	Whisky	Brandy	Rum	Koňak 1	Bourbon	Koňak 2
Počet zúčastnených laboratórií	10	10	10	10	10	10	10
Počet akceptovaných výsledkov (laboratórií)	9	8	9	8	8	8	8
Stredná hodnota [v mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15	
Štandardná odchýlka opakovateľnosti $s_r$ [v mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040	
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti $RSD_R$ [v %]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7	
Limit opakovateľnosti $r$ [v mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011	
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $s_R$ [v mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02	
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti $RSD_R$ [v %]	15	16	23	17	15	15	
Limit reprodukovateľnosti $R$ [v 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'.