

II

(Atti non legislativi)

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2016/635 DELLA COMMISSIONE

del 22 aprile 2016

che modifica l'allegato del regolamento (CE) n. 2870/2000 per quanto riguarda taluni metodi d'analisi di riferimento applicabili nel settore delle bevande spiritose

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CE) n. 110/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 gennaio 2008, relativo alla definizione, alla designazione, alla presentazione, all'etichettatura e alla protezione delle indicazioni geografiche delle bevande spiritose e che abroga il regolamento (CEE) n. 1576/89 del Consiglio ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 28 paragrafo 2,

considerando quanto segue:

- (1) il regolamento (CE) n. 2870/2000 della Commissione ⁽²⁾ elenca e descrive i metodi d'analisi di riferimento applicabili nel settore delle bevande spiritose. Tuttavia, alcuni dei metodi elencati nell'allegato di tale regolamento, tra i quali i metodi per la determinazione dell'acidità volatile e degli zuccheri totali nelle bevande alcoliche, non sono ancora stati descritti.
- (2) I metodi per la determinazione dell'acidità volatile e degli zuccheri totali in talune bevande spiritose sono stati sottoposti a due studi internazionali di convalida che si sono svolti in conformità delle procedure concordate a livello internazionale e i loro parametri di precisione del metodo sono stati giudicati accettabili. Gli studi condotti facevano parte di un progetto di ricerca nell'ambito del programma Normazione, misure e prove del quarto programma quadro. La descrizione di tali metodi dovrebbe pertanto essere inclusa nell'allegato del regolamento (CE) n. 2870/2000.
- (3) Il regolamento (CE) n. 110/2008 stabilisce i requisiti per l'invecchiamento di talune categorie di bevande spiritose in fusti di legno e prevede che altre categorie possano essere sottoposte a tale invecchiamento. L'analisi dei principali composti provenienti dal legno può essere utile quando si determina se un campione è conforme alla definizione corrispondente alla pertinente categoria di bevanda spiritosa. L'Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV) ha riconosciuto un metodo di analisi per la determinazione di tali composti nella sua risoluzione OIV/OENO 382 A/2009. Il riconoscimento del metodo si è basato sui dati ottenuti da uno studio internazionale sulla precisione del metodo condotto su diverse bevande spiritose e svolto secondo procedure concordate a livello internazionale. Tale metodo e la relativa descrizione dovrebbero pertanto essere aggiunti ai metodi di riferimento dell'Unione per l'analisi delle bevande spiritose stabilita all'allegato del regolamento (CE) n. 2870/2000.
- (4) È pertanto opportuno modificare di conseguenza il regolamento (CE) n. 2870/2000.
- (5) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del Comitato per le bevande spiritose,

⁽¹⁾ GUL 39 del 13.2.2008, pag. 16.

⁽²⁾ Regolamento (CE) n. 2870/2000 della Commissione, del 19 dicembre 2000, che definisce i metodi d'analisi comunitari di riferimento applicabili nel settore delle bevande spiritose (GUL 333 del 29.12.2000, pag. 20).

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato del regolamento (CE) n. 2870/2000 è modificato conformemente all'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 22 aprile 2016

Per la Commissione
Il presidente
Jean-Claude JUNCKER

ALLEGATO

L'allegato del regolamento (CE) n. 2870/2000 è così modificato:

1) l'indice è modificato come segue:

a) ai punti III.3 e VIII, il termine «(p.m.)» è soppresso;

b) è aggiunto il punto seguente:

«X. Determinazione dei composti del legno: furfurolo, furfurolo idrossi-5-metile, metil-5 furfurolo, vanillina, siringaldeide, coniferaldeide, sinapaldeide, acido gallico, acido ellagico, acido vanillico, acido siringico e scopoletina.»;

2) al capo III è aggiunta la parte seguente:

«III.3. DETERMINAZIONE DELL'ACIDITÀ VOLATILE NELLE BEVANDE SPIRITOSE

1. Campo di applicazione

Il metodo è stato convalidato in uno studio inter-laboratorio per il rum, il brandy e le acquaviti di frutta e di vinaccia a livelli che vanno da 30 mg/l a 641 mg/l.

2. Riferimenti normativi

ISO 3696: 1987 Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova

3. Definizioni

3.1. L'acidità volatile è calcolata sottraendo l'acidità fissa dall'acidità totale.

3.2. L'acidità totale è la somma delle acidità titolabili.

3.3. L'acidità fissa è l'acidità del residuo dopo l'evaporazione della bevanda spiritosa a secco.

4. Principio

L'acidità totale e l'acidità fissa sono determinate per titolazione o con il metodo potenziometrico.

5. Reagenti e materiali

Per l'analisi, salvo indicazione contraria, utilizzare esclusivamente reagenti di categoria analitica identificata ed acqua almeno di categoria 3, quale definita dalla norma ISO 3696:1987.

5.1. Soluzione 0,01 M di idrossido di sodio (NaOH)

5.2. Soluzione di indicatore misto:

pesare 0,1 g di carminio d'indaco e 0,1 g di rosso fenolo;

sciogliere in 40 ml di acqua e portare a 100 g con etanolo.

6. Apparecchiature e attrezzature

Apparecchiatura di laboratorio indiretta, vetreria graduata di categoria A e quanto segue:

6.1. Pompa ad acqua

- 6.2. Evaporatore rotante o bagno a ultrasuoni
- 6.3. Materiale per titolazione potenziometrica (facoltativo)

7. **Campionatura e campioni**

I campioni vengono conservati a temperatura ambiente fino al momento dell'analisi.

8. **Modo di operare**

8.1. Acidità totale

8.1.1. Preparazione del campione

La bevanda spiritosa viene irradiata con ultrasuoni (sonicazione) o agitata per due minuti sotto vuoto per liberarla dall'anidride carbonica, se necessario.

8.1.2. Titolazione

Pipettare 25 ml di bevanda spiritosa in un matraccio di Erlenmeyer da 500 ml.

Aggiungere circa 200 ml di acqua distillata bollita e raffreddata (preparata nello stesso giorno) e 2-6 gocce della soluzione di indicatore misto (5.2).

Titolare con la soluzione 0,01 M di idrossido di sodio (5.1) fino a che il colore da verde-giallastro vira al violetto nel caso delle bevande spiritose incolori, o fino a quando da giallo-bruno vira a rosso-bruno nel caso delle bevande spiritose di colore bruno.

La titolazione può essere realizzata anche tramite potenziometria a pH 7,5.

Sia $n_{1\text{ ml}}$ il volume della soluzione di idrossido di sodio 0,01 M aggiunto.

8.1.3. Calcolo

L'acidità totale (AT), espressa in milliequivalenti per litro di bevanda spiritosa è pari a $0,4 \times n_1$.

L'acidità totale (AT'), espressa in mg di acido acetico per litro di bevanda spiritosa è pari a: $24 \times n_1$.

8.2. Acidità fissa

8.2.1. Preparazione del campione

Far evaporare 25 ml di bevanda spiritosa a secco:

pipettare 25 ml di bevanda spiritosa in una capsula d'evaporazione cilindrica a fondo piatto del diametro di 55 mm. Durante la prima ora di evaporazione, la capsula viene posta sul coperchio di un bagno criotermostatico bollente in modo che il liquido non venga portato all'ebollizione, perché ciò potrebbe provocare qualche perdita per schizzi.

Terminare l'essiccazione ponendo la capsula in un forno a 105 °C per altre due ore. Lasciare quindi raffreddare la capsula in un essiccatoio.

8.2.2. Titolazione

Dissolvere il residuo lasciato per evaporazione con acqua distillata bollita e raffreddata (preparata il giorno stesso), portare al volume di circa 100 ml e aggiungere 2-6 gocce di soluzione di indicatore misto (5.2).

Titolare con la soluzione 0,01 M di idrossido di sodio (5.1).

La titolazione può essere realizzata anche con il metodo potenziometrico a pH 7,5.

Sia $n_{2,ml}$ il volume della soluzione 0,01 M di idrossido di sodio aggiunta.

8.2.3. Calcolo

L'acidità fissa (FA), espressa in milliequivalenti per litro di bevanda spiritosa è: $0,4 \times n_2$.

L'acidità fissa (FA), espressa in mg di acido acetico per litro di bevanda spiritosa è: $24 \times n_2$.

9. Calcolo dell'acidità volatile

9.1. Espressione in milliequivalenti per litro:

sia

TA = l'acidità totale in milliequivalenti per litro

FA = l'acidità fissa in milliequivalenti per litro

L'acidità volatile, VA, in milliequivalenti per litro è:

$$TA - FA$$

9.2. Espressione in mg di acido acetico per L:

sia

TÀ = l'acidità totale in mg di acido acetico per L

FÀ = l'acidità fissa in mg di acido acetico per L

L'acidità volatile, VA, in mg di acido acetico per litro è:

$$TÀ - FÀ$$

9.3. L'espressione in g di acido acetico per hl di alcol puro al 100 % vol è: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

in cui A è il titolo alcolometrico volumico della bevanda spiritosa.

10. Precisione del metodo

10.1. Risultati statistici delle prove interlaboratorio

Uno studio sulla precisione del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale, ha prodotto i seguenti risultati [1] [2].

Anno della prova interlaboratorio: 2000

Numero di laboratori 18

Numero di campioni 6

Campioni	A	B	C	D	E	F
Numero dei laboratori considerati dopo l'eliminazione degli aberranti	16	18	18	14	18	18
Numero di risultati aberranti (laboratori)	2			4		
Numero di risultati accettati	32	36	36	28	36	36
Media (\bar{x}) [mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/L]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD _r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Limite di ripetibilità, r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD _R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Limite di riproducibilità, R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Tipi di campione:

A Acquavite di prugne; frazione *

B Rum I; in doppio cieco

C Rum II; frazione *

D Slivovitz; in doppio cieco

E Brandy; in doppio cieco

F Acquavite di vinaccia; in doppio cieco

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

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

3) è inserito il seguente capitolo VIII:

«VIII. ZUCCHERI TOTALI

1. Campo di applicazione

Il metodo HPLC-RI è applicabile per la determinazione degli zuccheri totali (espressi in zucchero invertito) nelle bevande spiritose, ad esclusione dei liquori contenenti uova e prodotti lattiero-caseari.

Il metodo è stato convalidato in uno studio inter-laboratorio per il *pastis*, l'anice distillato, il liquore di ciliegia, la crema di (nome del frutto o della materia prima utilizzata) e la *crème de cassis*, a livelli da 10,86 g/l a 509,7 g/l. Tuttavia, la linearità di risposta dello strumento è stata comprovata per l'intervallo di concentrazione da 2,5 g/l a 20,0 g/l.

Il metodo non è destinato alla determinazione di bassi livelli di zuccheri.

2. Riferimenti normativi

ISO 3696:1987 Acqua di qualità analitica — Specifiche e metodi di prova.

3. Principio

Analisi mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni di soluzioni di zuccheri al fine di determinare le concentrazioni di glucosio, fruttosio, saccarosio, maltosio e lattosio.

Questo metodo utilizza una fase stazionaria di alchilammina e una rilevazione mediante rifrattometro differenziale ed è descritto come esempio. Come fase stazionaria è anche possibile l'impiego di resine scambiatrici di anioni.

4. Reagenti e materiali

- 4.1. Glucosio (CAS 50-99-7), puro almeno al 99 %.
- 4.2. Fruttosio (CAS 57-48-7), puro almeno al 99 %.
- 4.3. Saccarosio (CAS 57-50-1), puro almeno al 99 %.
- 4.4. Lattosio (CAS 5965-66-2), puro almeno al 99 %.
- 4.5. Monoidrato di maltosio (CAS 6363-53-7), puro almeno al 99 %.
- 4.6. Acetonitrile puro (CAS 75-05-8) per analisi HPLC.
- 4.7. Acqua distillata o demineralizzata, preferibilmente microfiltrata.

4.8. Solventi (esempio):

Il solvente di eluizione è composto da:

75 parti per volume di acetonitrile (4.6),

25 parti per volume di acqua distillata (4.7).

Prima dell'utilizzo, degassare tramite gorgogliamento di elio a bassa portata per 5-10 minuti.

Se l'acqua utilizzata non è stata microfiltrata, si raccomanda di passare il solvente su un filtro per solventi organici con diametro dei pori inferiore o pari a 0,45 µm.

- 4.9. Etanolo assoluto (CAS 64-17-5).
- 4.10. Soluzione di etanolo (5 %, v/v).
- 4.11. Preparazione della soluzione madre di taratura (20 g/l)

Pesare 2 g di ciascuno zucchero da analizzare (da 4.1 a 4.5), trasferirli senza perdite in un matraccio tarato da 100 ml. (NB, 2,11 g di monoidrato di maltosio sono equivalenti a 2 g di maltosio).

Portare a 100 ml con una soluzione di alcol al 5 % vol (4.10), agitare e conservare a circa + 4 °C. Preparare una nuova soluzione madre una volta alla settimana.

4.12. Preparazione delle soluzioni figlie di taratura (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 20,0 g/l)

Diluire opportunamente la soluzione madre a 20 g/l, (4.11) con una soluzione di alcol al 5 % vol. (4.10) per ottenere cinque soluzioni standard di 2,5 — 5,0 — 7,5 — 10,0 e 20,0 g/l. Filtrare con un filtro i cui pori abbiano un diametro inferiore o pari a 0,45 µm (5.3).

5. **Apparecchi e attrezzatura**

5.1. Sistema HPLC in grado di ottenere il ritorno alla linea di base quando si analizzano tutti gli zuccheri.

5.1.1. Cromatografo liquido ad alte prestazioni con valvola di iniezione a sei canali dotata di loop da 10 µl o di qualsiasi altro dispositivo automatico o manuale per un'iniezione affidabile di microvolumi.

5.1.2. Sistema di pompaggio che consenta di ottenere e mantenere un flusso costante o programmato con grande precisione.

5.1.3. Rifrattometro differenziale.

5.1.4. Integratore o registratore informatico compatibile con le altre apparecchiature.

5.1.5. Pre-colonna:

Si raccomanda di disporre una pre-colonna opportuna prima della colonna analitica.

5.1.6. Colonna (esempio):

Materiale: acciaio inossidabile o vetro

Diametro interno: 2-5 millimetri

Lunghezza: 100-250 millimetri variabile in funzione della taglia delle particelle); per esempio, 250 millimetri se le particelle hanno un diametro di 5 µm.

Fase stazionaria: gruppi funzionali alchilammine legati a silice, diametro massimo delle particelle 5 µm.

5.1.7. Condizioni cromatografiche (esempio):

Solvente di eluizione (4.8), flusso: 1 ml/minuto.

Rilevazione: rifrattometria differenziale.

Per assicurarsi che il rivelatore sia perfettamente stabile, potrebbe essere utile avviarlo alcune ore prima dell'uso. La cella di riferimento deve essere riempita con solvente di eluizione.

5.2. Bilancia analitica con precisione a 0,1 mg.

5.3. Sistema di filtraggio per piccoli volumi tramite una micromembrana con pori del diametro di 0,45 µm.

6. **Conservazione dei campioni**

Una volta ricevuti, i campioni devono essere conservati a temperatura ambiente prima di essere analizzati.

7. **Modo di operare**

7.1. PARTE A: preparazione del campione

7.1.1. Agitare il campione.

7.1.2. Filtrare il campione con un filtro con pori di diametro inferiore o pari a 0,45 µm (5.3).

7.2. PARTE B: HPLC

7.2.1. Determinazione

Iniettare 10 µl delle soluzioni di taratura (4.12) e i campioni (7.1.2). Eseguire l'analisi nelle opportune condizioni cromatografiche, per esempio come precedentemente indicato.

- 7.2.2. Se un qualsiasi picco di un campione possiede una superficie (o un'altezza) superiore al picco corrispondente nella soluzione di taratura più concentrata, occorrerà diluire il campione con acqua distillata e procedere nuovamente all'analisi.

8. Calcolo

Confrontare i due cromatogrammi ottenuti per la soluzione di taratura e per la bevanda spiritosa. Identificare i picchi tramite il loro tempo di ritenzione. Misurare la superficie (o altezza) per calcolare le concentrazioni con il metodo di taratura esterna. Tener conto di tutte le diluizioni effettuate durante la preparazione del campione.

Il risultato finale è rappresentato dalla somma di saccarosio, lattosio, maltosio, glucosio e fruttosio, espressa in g/l di zucchero invertito.

Lo zucchero invertito è calcolato come somma di tutti i monosaccaridi e i disaccaridi riduttori presenti (ad esempio glucosio, fruttosio, lattosio, maltosio) in aggiunta al quantitativo stechiometrico di glucosio e di fruttosio calcolato a partire dal saccarosio presente.

$$\text{Zucchero invertito (g/l)} = \text{glucosio(g/l)} + \text{fruttosio (g/l)} + \text{maltosio (g/l)} + \text{lattosio (g/l)} + \text{saccarosio (g/l)} \times 1,05.$$

$$1,05 = (\text{peso molecolare del fruttosio} + \text{peso molecolare del glucosio}) / \text{peso molecolare del saccarosio}.$$

9. Precisione del metodo

9.1. Risultati statistici delle prove interlaboratorio

Uno studio sulla precisione del metodo, condotto secondo procedure convenute a livello internazionale, ha prodotto i seguenti risultati [1] [2].

Anno della prova interlaboratorio: 2000

Numero di laboratori 24

Numero di campioni 8

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

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

Tabella 1

Fruttosio, glucosio, maltosio

Analita	Fruttosio		Glucosio			Maltosio	
	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Bevanda spiritosa all'anice	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Bevanda spiritosa all'anice	Standard (10 g/l)
MEDIA [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Numero di laboratori senza dati aberranti	21	22	21	23	19	21	22
Deviazione standard di ripetibilità s _p [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analita	Fruttosio		Glucosio			Maltosio	
	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Bevanda spiritosa all'anice	Crème de cassis	Standard (50 g/l)	Bevanda spiritosa all'anice	Standard (10 g/l)
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Limite di ripetibilità, r [g/l] ($r = 2,8 \times sr$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times sR$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabella 2

Saccarosio

Analita	Saccarosio					
	Pastis	Ouzo	Liquore di ciliegia	Crème de menthe	Crème de cassis	Standard (100 g/l)
MEDIA [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Numero di laboratori senza dati aberranti	19	19	20	18	18	18
Deviazione standard di ripetibilità s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Limite di ripetibilità, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) frazione

Tabella 3

Zuccheri totali

(Nota: questi dati sono stati calcolati per gli zuccheri totali, non per lo zucchero invertito quale definito nella sezione 8).

Campioni	Pastis	Ouzo	Bevanda spiritosa all'anice	Liquore di ciliegia	Crème de menthe	Crème de cassis	Standard (220 g/l)
MEDIA [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
N. di laboratori senza dati aberranti	20	19	20	20	18	18	19
Deviazione standard di ripetibilità s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Limite di ripetibilità, r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Limite di riproducibilità R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) frazione»

4) è aggiunto il seguente capitolo X:

«X. DETERMINAZIONE DEI SEGUENTI COMPOSTI DEL LEGNO NELLE BEVANDE SPIRITOSE MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI (HPLC): FURFUROLO, FURFUROLO IDROSSI-5-METILE, METIL-5 FURFUROLO, VANILLINA, SIRINGALDEIDE, CONIFERALDEIDE, SINAPALDEIDE, ACIDO GALLICO, ACIDO ELLAGICO, ACIDO VANILLICO, ACIDO SIRINGICO E SCOPOLETINA

1. **Campo di applicazione**

Il metodo ha come obiettivo il dosaggio del furfurolo, del furfurolo idrossi-5-metile e del metil-5 furfurolo, della vanillina, della siringaldeide, della coniferaldeide e della sinapaldeide, nonché degli acidi gallici ed ellagici, degli acidi vanillici, dell'acido sirringico e della scopoletina per cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni.

2. **Riferimenti normativi**

Metodo di analisi riconosciuto dall'assemblea generale dell'Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV) e pubblicato dall'OIV con il riferimento OIV-MA-BS-16: R2009.

3. **Principio**

Dosaggio per cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), con individuazione tramite spettrometria ultra-violetta a più lunghezze d'onda e tramite spettrofluometria.

4. Reagenti

I reagenti devono essere di qualità analitica. L'acqua utilizzata deve essere acqua distillata o acqua avente una purezza equivalente. È auspicabile utilizzare acqua microfiltrata la cui resistività sia 18,2 MΩ.cm.

- 4.1. Alcool a 96 % vol.
- 4.2. Metanolo di qualità HPLC (solvente B).
- 4.3. Acido acetico diluito allo 0,5 % vol. (solvente A).
- 4.4. Fasi mobili: (solo a titolo esemplificativo).

Solvente A (acido acetico allo 0,5 %) e solvente B (metanolo puro). Filtrare su membrana (porosità 0,45 µm). Degasare in bagno a ultrasuoni, se necessario.

- 4.5. Standard di riferimento al 99 % di purezza minima: furfurolo, furfurolo idrossi-5-metile, metil-5 furfurolo, vanillina, siringaldeide, coniferaldeide, sinapaldeide, acido gallico, acido ellagico, acido vanillico, acido siringico e scopoletina.
- 4.6. Soluzione di riferimento: le sostanze campione sono dissolte in una soluzione idroalcolica al 50 % vol.. Le concentrazioni finali nella soluzione di riferimento sono:

furfurolo: 5 mg/l; furfurolo idrossi-5-metile: 10 mg/l; metil-5 furfurolo: 2 mg/l; vanillina: 5 mg/l; siringaldeide: 10 mg/l; coniferaldeide: 5 mg/l; sinapaldeide: 5 mg/l; acido gallico: 10 mg/l; acido ellagico: 10 mg/l; acido vanillico: 5 mg/l; acido siringico: 5 mg/l; scopoletina: 0,5 mg/l.

5. Apparecchiature

Attuale materiale di laboratorio

- 5.1. Un cromatografo in fase liquida ad alte prestazioni in grado di operare in gradiente binario, dotato di:
 - 5.1.1. un rivelatore spettrofotometrico che permette la misurazione ad una lunghezza d'onda pari a 280 e 313 nm. Tuttavia, è preferibile operare con un rivelatore a lunghezze d'onda multiple, ad esempio a diodi al fine di poter confermare la purezza dei picchi.
 - 5.1.2. Un rivelatore per spettrofluometria, lunghezza d'onda di eccitazione: 354 nm, lunghezza d'onda di emissione: 446 nm (per il dosaggio finale della scopoletina; tuttavia quest'ultima è anche rilevabile a 313 nm in spettrofotometria).
 - 5.1.3. Un dispositivo di iniezione che permette l'introduzione di una presa di prova da 10 o 20 µl (ad esempio).
 - 5.1.4. Una colonna per la cromatografia liquida ad alte prestazioni del tipo RP C18, per la granulometria 5 µm al massimo.
- 5.2. Siringhe per HPLC.
- 5.3. Dispositivo di filtrazione di piccoli volumi su membrana.
- 5.4. Integratore-calcolatore o registratore le cui prestazioni siano compatibili con l'insieme dell'attrezzatura, in particolare tale apparecchio deve aver più canali di acquisizione.

6. Modo di operare

- 6.1. Preparazione della soluzione da iniettare

La soluzione di riferimento, nonché la bevanda spiritosa, sono filtrate se necessario su una membrana il cui diametro dei pori è uguale a 0,45 µm al massimo.

- 6.2. Condizioni operative cromatografiche: effettuazione dell'analisi a temperatura ambiente per mezzo delle apparecchiature descritte al paragrafo 5.1 e utilizzando le fasi mobili (4.4) con una portata di circa 0,6 ml al minuto secondo il programma di seguito illustrato (solo a titolo esemplificativo).

Tempi: 0 min 50 min 70 min 90 min

solvente A (acqua-acido): 100 % 60 % 100 % 100 %

solvente B (metanolo): 0 % 40 % 0 % 0 %

Tuttavia in alcuni casi questo gradiente deve essere modificato per evitare delle coeluzioni.

- 6.3. Dosaggio

- 6.3.1. Iniettare i campioni di riferimento separatamente e successivamente miscelarli.

Adattare le condizioni operative in modo tale che i fattori di risoluzione dei picchi di tutti i composti siano almeno uguali a 1.

- 6.3.2. Iniettare il campione come preparato seguendo le istruzioni al paragrafo 6.1.

- 6.3.3. Misurare la superficie dei picchi nella soluzione di riferimento e nella bevanda spiritosa e calcolare le concentrazioni.

7. Rappresentazione dei risultati

Esprimere la concentrazione di ogni costituente in mg/l.

8. Caratteristiche di resa del metodo (precisione)

I dati seguenti sono stati ottenuti nel 2009 a partire da uno studio internazionale di efficienza del metodo su varie bevande spiritose, effettuato secondo le procedure riconosciute a livello internazionale [1], [2].

- 8.1. Furfurale

Analita	Furfurale					
	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Campioni						
Numero di laboratori partecipanti	15	15	15	15	15	15
Numero di risultati accettati (laboratori)	14	12	13	14	13	13
MEDIA [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD _r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analita	Furfurale						
	Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]		0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]		8	15	5	13	3	5
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-Idrossimetilfurfurale

Analita	5-Idrossimetilfurfurale						
	Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti		16	16	16	16	16	16
Numero di risultati accettati (laboratori)		14	14	14	14	14	14
MEDIA [mg/l]		5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]		0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]		1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]		0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]		8	9	5	13	7	9
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-Metilfurfurale

Analita	5-Metilfurfurale					
Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti	11	11	11	11	11	11
Numero di risultati accettati (laboratori)	11	11	8	11	10	11
MEDIA [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanillina

Analita	Vanillina					
Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti	16	15	16	16	16	16
Numero di risultati accettati (laboratori)	16	15	16	16	16	16
MEDIA [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analita	Vanillina						
	Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]		6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]		0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]		19	25	15	22	13	16
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Siringaldeide

Analita	Siringaldeide						
	Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti		16	15	16	16	16	16
Numero di risultati accettati (laboratori)		13	13	13	12	14	13
MEDIA [mg/l]		1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]		0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]		2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]		0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]		8	33	5	6	4	4
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Coniferaldeide

Analita	Coniferaldeide					
Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti	13	12	13	12	13	13
Numero di risultati accettati (laboratori)	12	12	13	12	13	13
MEDIA [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinapaldeide

Analita	Sinapaldeide					
Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti	14	14	14	14	15	14
Numero di risultati accettati (laboratori)	14	13	12	13	13	12
MEDIA [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analita	Sinapaldeide						
	Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]		7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]		0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]		31	27	46	13	10	73
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Acido gallico

Analita	Acido gallico						
	Campione	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti		16	15	16	16	16	16
Numero di risultati accettati (laboratori)		15	14	16	16	16	16
MEDIA [mg/l]		1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]		0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]		6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]		0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]		36	47	31	53	30	35
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Acido ellagico

Analita	Acido ellagico					
Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti	7	7	7	7	7	7
Numero di risultati accettati (laboratori)	7	7	7	7	7	6
MEDIA [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Acido vanillico

Analita	Acido vanillico					
Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti	15	15	15	15	15	15
Numero di risultati accettati (laboratori)	12	11	14	14	15	14
MEDIA [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analita	Acido vanillico						
	Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]		14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]		0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]		28	20	35	31	51	26
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Acido siringico

Analita	Acido siringico						
	Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti		16	15	16	16	16	16
Numero di risultati accettati (laboratori)		16	15	15	15	16	15
MEDIA [mg/l]		0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]		0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]		6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)		0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]		0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]		19	29	11	18	13	14
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)		0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Scopoletina

Analita	Scopoletina						
	Campioni	Whisky	Brandy	Rum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Numero di laboratori partecipanti	10	10	10	10	10	10	10
Numero di risultati accettati (laboratori)	9	8	9	8	8	8	8
MEDIA [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15	
Deviazione standard di ripetibilità s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040	
Deviazione standard relativa di ripetibilità, RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7	
Limite di ripetibilità, r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0007	0002	0005	0004	0015	0011	
Deviazione standard di riproducibilità, s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02	
Deviazione standard relativa di riproducibilità, RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15	
Limite di riproducibilità, R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06	

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

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