

KOMMISJONENS GJENNOMFØRINGSFORORDNING (EU) 2016/635**2019/EØS/47/59**

av 22. april 2016

om endring av vedlegget til forordning (EF) nr. 2870/2000 med hensyn til visse referansemetoder for analyse av alkoholsterke drikker(*)

EUROPAKOMMISJONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den europeiske unions virkemåte,

under henvisning til europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 110/2008 av 15. januar 2008 om definisjon av, betegnelse på og presentasjon, merking og beskyttelse av geografiske betegnelser på alkoholsterke drikker, og om oppheving av rådsforordning (EØF) nr. 1576/89⁽¹⁾, særlig artikkel 28 nr. 2, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Kommisjonsforordning (EF) nr. 2870/2000⁽²⁾ inneholder en fortegnelse over og en beskrivelse av referansemetodene for analyse av alkoholsterke drikker. Enkelte av metodene oppført i vedlegget til nevnte forordning, herunder metoder for bestemmelse av innholdet av flyktige syrer og totalt sukkerinnhold i alkoholsterke drikker, er imidlertid ennå ikke beskrevet.
- 2) Metodene for bestemmelse av innholdet av flyktige syrer og totalt sukkerinnhold i visse alkoholsterke drikker har vært gjenstand for to internasjonale valideringsundersøkelser foretatt i henhold til internasjonalt anerkjente framgangsmåter, og metodenes ytelsesparametere er funnet å være akseptable. Undersøkelsene ble utført som en del av et forskningsprosjekt som inngikk i programmet for standarder, målinger og prøving i Europakommisjonens fjerde rammeprogram. Beskrivelsen av nevnte metoder bør derfor angis i vedlegget til forordning (EF) nr. 2870/2000.
- 3) Ved forordning (EF) nr. 110/2008 fastsettes krav til visse kategorier av alkoholsterke drikker som skal modnes i trefat, samt at andre kategorier kan gjennomgå en slik modningsprosess. Det kan være nyttig å analysere de viktigste forbindelsene som stammer fra tre, ved vurderingen av om en prøve er i samsvar med definisjonen av den relevante kategorien av alkoholsterke drikker. Den internasjonale vinorganisasjon (OIV) har anerkjent en analysemetode til bestemmelse av nevnte forbindelser i sin resolusjon OIV/OENO 382A/2009. Anerkjennelsen av metoden bygget på opplysninger fra en internasjonal metodeytelsesundersøkelse av ulike alkoholsterke drikker foretatt i henhold til internasjonalt anerkjente framgangsmåter. Denne metoden og beskrivelsen av den bør derfor tilføyes Unionens referansemetoder for analyse av alkoholsterke drikker angitt i vedlegget til forordning (EF) nr. 2870/2000.
- 4) Forordning (EF) nr. 2870/2000 bør derfor endres.
- 5) Tiltakene fastsatt i denne forordning er i samsvar med uttalelse fra Komiteen for alkoholsterke drikker —

(*) Denne unionsrettsakten, kunngjort i EUT L 108 av 23.4.2016, s. 1, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 57/2017 av 17. mars 2017 om endring av EØS-avtalens vedlegg II (Tekniske forskrifter, standarder, prøving og sertifisering), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 81 av 29.11.2018, s. 28.

⁽¹⁾ EUT L 39 av 13.2.2008, s. 16.

⁽²⁾ Kommisjonsforordning (EF) nr. 2870/2000 av 19. desember 2000 om fastsettelse av Fellesskapets referansemetoder for analyse av alkoholsterke drikker (EFT L 333 av 29.12.2000, s. 20).

VEDTATT DENNE FORORDNING:

Artikkel 1

Vedlegget til forordning (EF) nr. 2870/2000 endres i samsvar med vedlegget til denne forordning.

Artikkel 2

Denne forordning trer i kraft den tredje dagen etter at den er kunngjort i *Den europeiske unions tidende*.

Denne forordning er bindende i alle deler og kommer direkte til anvendelse i alle medlemsstater.

Utferdiget i Brussel 22. april 2016.

For Kommissjonen

Jean-Claude JUNCKER

President

VEDLEGG

I vedlegget til forordning (EF) nr. 2870/2000 gjøres følgende endringer:

1) I innholdsfortegnelsen gjøres følgende endringer:

a) I nr. III.3 og VIII utgår termen «(p.m.)».

b) Nytt nummer skal lyde:

«X. Bestemmelse av treforbindelser: Furfural, 5-hydroksymetylfurfural, 5-metylfurfural, vanillin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, gallussyre, ellaginsyre, vanillinsyre, syringinsyre og skopoletin.»

2) I kapittel III tilføyes følgende del:

«III.3 BESTEMMELSE AV INNHOLDET AV FLYKTIGE SYRER I ALKOHOLSTERKE DRIKKER

1. **Virkeområde**

Metoden er blitt validert i en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier av rom, brandy, brennevin av pressrester og fruktbrennevin, på nivåer fra 30 mg/l til 641 mg/l.

2. **Referanse til standarder**

ISO 3696:1987: Vann til analytisk laboratoriebruk – spesifikasjon og prøvingsmetoder.

3. **Definisjoner**

3.1. Innholdet av flyktige syrer beregnes ved å trekke innholdet av ikke-flyktige syrer fra det totale syreinnholdet.

3.2. Totalt syreinnhold er summen av titrerbare syrer.

3.3. Innholdet av ikke-flyktige syrer er syreinnholdet i den resten som gjenstår etter at den alkoholsterke drikken er inndampet til tørrhet.

4. **Prinsipp**

Totalt syreinnhold og innholdet av ikke-flyktige syrer bestemmes ved titrering eller ved potensiometri.

5. **Reagenser og materialer**

Under analysen skal det, med mindre annet er angitt, bare brukes reagenser av anerkjent analysekvalitet og vann minst av klasse 3 som definert i standarden ISO 3696:1987.

5.1. 0,01 M natriumhydroksidløsning (NaOH)

5.2. Indikatorblanding:

Vei opp 0,1 g indigokarmin og 0,1 g fenolrødt.

Løs opp i 40 ml vann og fyll med etanol til 100 ml.

6. **Utstyr**

Indirekte laboratorieutstyr, glasstøy av klasse A og følgende:

6.1. Vannpumpe

- 6.2. Rotasjonsfordamper eller ultralydbad
- 6.3. Utstyr til potensiometrisk titrering (valgfritt)

7. Prøvetaking og prøver

Prøvene oppbevares ved romtemperatur før analysering.

8. Framgangsmåte

8.1. Totalt syreinnhold

8.1.1. Tillaging av prøve

Den alkoholsterke drikken bestråles med ultralyd (sonikering) eller omrøres i to minutter under vakuum for å fjerne eventuelt karbondioksid.

8.1.2. Titrering

Pipetter 25 ml av den alkoholsterke drikken over i en 500 ml erlenmeyerkolbe.

Tilsett ca. 200 ml avkjølt, kokt destillert vann (tillages på nytt hver dag) og 2–6 dråper av indikatorblandingen (5.2).

Titrer med 0,01 M natriumhydroksidløsning (5.1) til den gulgrønne fargen endres til fiolett for fargeløse alkoholsterke drikker og den gulbrune fargen endres til rødbrun for brunfargede alkoholsterke drikker.

Titreringen kan også utføres ved potensiometri til pH 7,5.

Antall ml tilsatt 0,01 M natriumhydroksidløsning uttrykkes som n_1 .

8.1.3. Beregning

Totalt syreinnhold (TA) uttrykt i milliekvivalenter per liter alkoholsterk drikke er lik $0,4 \times n_1$.

Totalt syreinnhold (TA') uttrykt i milligram eddiksyre per liter alkoholsterk drikke er lik $24 \times n_1$.

8.2. Innhold av ikke-flyktige syrer

8.2.1. Tillaging av prøve

Inndamp 25 ml av den alkoholsterke drikken til tørrhet:

Pipetter 25 ml av den alkoholsterke drikken over i en flatbunnet sylindrisk inndampingsskål med en diameter på 55 mm. I den første timen av inndampingen plasseres inndampingsskålen på lokket til et kokende vannbad slik at væsken ikke koker, ettersom det kan føre til tap ved spruting.

Avslutt tørkingen ved å la inndampingsskålen stå to timer i tørkeovn ved 105 °C. Inndampingsskålen avkjøles i en eksikkator.

8.2.2. Titrering

Løs opp restene etter inndampingen med avkjølt, kokt destillert vann (tillages på nytt hver dag), fyll opp til ca. 100 ml og tilsett 2–6 dråper av indikatorblandingen (5.2).

Titrer med 0,01 M natriumhydroksidløsning (5.1).

Titreringen kan også utføres ved potensiometri til pH 7,5.

Antall ml tilsatt 0,01 M natriumhydroksidløsning uttrykkes som n_2 .

8.2.3. Beregning

Innholdet av ikke-flyktige syrer (FA) uttrykt i milliekvivalenter per liter alkoholsterk drikke er lik $0,4 \times n_2$.

Innholdet av ikke-flyktige syrer (FA) uttrykt i milligram eddiksyre per liter alkoholsterk drikke er lik $24 \times n_2$.

9. Beregning av innholdet av flyktige syrer

9.1. Uttrykt i milliekvivalenter per liter:

Der:

TA = totalt syreinnhold i milliekvivalenter per liter

FA = innhold av ikke-flyktige syrer i milliekvivalenter per liter

Innholdet av flyktige syrer (VA) i milliekvivalenter per liter er lik:

TA – FA.

9.2. Uttrykt i milligram eddiksyre per liter:

Der:

TA' = totalt syreinnhold i milligram eddiksyre per liter

FA' = innhold av ikke-flyktige syrer i milligram eddiksyre per liter

Innholdet av flyktige syrer (VA) i milligram eddiksyre per liter er lik:

TA' – FA'.

9.3. Uttrykt i gram eddiksyre per hektoliter ren alkohol (100 volumprosent) er lik: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

der A er alkoholstyrken i volumprosent i den alkoholsterke drikken.

10. Metodens robusthet (presisjon)

10.1. Statistiske resultater av analyser foretatt ved flere laboratorier

Følgende opplysninger er hentet fra en internasjonal metodeytelsesundersøkelse foretatt i henhold til internasjonalt anerkjente framgangsmåter⁽¹⁾/⁽²⁾.

År for analyse foretatt ved flere laboratorier **2000**

Antall laboratorier 18

Antall prøver 6

Prøver	A	B	C	D	E	F
Antall laboratorier etter eliminering av laboratorier med avvikende resultater	16	18	18	14	18	18
Antall laboratorier med avvikende resultater	2			4		
Antall godkjente resultater	32	36	36	28	36	36
Gjennomsnittsverdi (x) (mg/l)	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Standardavvik for repeterbarhet, s _r (mg/l)	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Relativt standardavvik for repeterbarhet (RSD _r) (%)	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l)	23	10	42	10	19	24
Standardavvik for reproduserbarhet, s _R (mg/l)	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD _R (%)	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Reproducerbarhetsgrense, R (mg/l)	24	23	70	13	38	68

Prøvetyper:

- A Plommebrennevin, to nivåer*
- B Rom I, blindede duplikater
- C Rom II, to nivåer*
- D Slivovitsj, blindede duplikater
- E Brandy, blindede duplikater
- F Brennevin av pressrester, blindede duplikater.

(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) Nytt kapittel VIII skal lyde:

«VIII. **TOTALT SUKKERINNHOLD**

1. **Virkeområde**

Metoden HPLC-RI får anvendelse på bestemmelse av totalt sukkerinnhold (uttrykt som invertsukker) i alkoholsterke drikker, med unntak av likører som inneholder egg- og melkeprodukter.

Metoden er blitt validert i en undersøkelse foretatt ved flere laboratorier av pastis, destillert anis, kirsebærlikør, crème de (etterfulgt av navnet på en frukt eller det råstoffet som er brukt) og crème de cassis, på nivåer fra 10,86 g/l til 509,7 g/l. Instrumentresponsens linearitet ble imidlertid påvist for konsentrasjonsområdet 2,5 g/l til 20,0 g/l.

Denne metoden er ikke egnet til bestemmelse av lavt sukkerinnhold.

2. Referanse til standarder

ISO 3696:1987: Vann til analytisk laboratoriebruk – spesifikasjon og prøvingsmetoder.

3. Prinsipp

Analyse av sukkerløsninger ved hjelp av høytrykksvæskeskromatografi for å bestemme konsentrasjonen av glukose, fruktose, sukrose, maltose og laktose.

Denne metoden bruker en stasjonærfase av alkylaminer og påvisning ved differensialrefraktometri, og er angitt som eksempel. Det er også mulig å bruke anionebytterharpikser som stasjonærfase.

4. Reagenser og materialer

- 4.1. Glukose (CAS-nr. 50-99-7) med en renhetsgrad på minst 99 %.
- 4.2. Fruktose (CAS-nr. 57-48-7) med en renhetsgrad på minst 99 %.
- 4.3. Sukrose (CAS-nr. 57-50-1) med en renhetsgrad på minst 99 %.
- 4.4. Laktose (CAS-nr. 5965-66-2) med en renhetsgrad på minst 99 %.
- 4.5. Maltosemonohydrat (CAS-nr. 6363-53-7) med en renhetsgrad på minst 99 %.
- 4.6. Ren acetonitril (CAS-nr. 75-05-8) til analysering med HPLC.
- 4.7. Destillert eller demineralisert vann, helst mikrofiltrert.

4.8. Løsemidler (eksempel)

Elueringsløsningen består av følgende:

75 volumdeler acetonitril (4.6),

25 volumdeler destillert vann (4.7).

Avgass ved å la helium passere langsomt gjennom i 5–10 minutter før bruk.

Dersom vannet som brukes, ikke er blitt mikrofiltrert, bør løsningen filtreres gjennom et filter for organiske løsemidler med en porestørrelse på mindre enn eller lik 0,45 µm.

- 4.9. Absolutt etanol (CAS-nr. 64-17-5).
- 4.10. Etanolløsning (5 %, v/v).
- 4.11. Tillaging av standardstamløsning (20 g/l)

Vei opp 2 g av hver av sukkerartene som skal analyseres (4.1–4.5), og overfør dem uten spill til en 100 ml målekolbe. (NB: 2,11 g maltosemonohydrat tilsvarer 2 g maltose).

Juster opp til 100 ml med en alkoholløsning på 5 volumprosent (4.10), rist og oppbevar ved rundt + 4 °C. Lag en ny stamløsning én gang i uken.

4.12. Tillaging av standardarbeidsløsninger (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 og 20,0 g/l)

Fortynn stamløsningen på 20 g/l (4.11) på egnet måte med en alkoholløsning på 5 volumprosent (4.10), slik at det gir fem arbeidsløsninger på 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 og 20,0 g/l. Filtrer gjennom et filter med en porestørrelse på mindre enn eller lik 0,45 µm (5.3).

5. Utstyr

5.1. HPLC-system som er i stand til å oppnå en grunnoppløsning av alle sukkerartene.

5.1.1. Høytrykksvæskerkromatograf med seksveis injeksjonsventil og 10 µl sløyfe eller annet automatisk eller manuelt utstyr som sikrer pålitelig injeksjon av mikrovolumer.

5.1.2. Pumpesystem som gjør det mulig å oppnå og opprettholde en konstant eller programmert strømningshastighet med stor nøyaktighet.

5.1.3. Differensialrefraktometer.

5.1.4. Dataintegrator eller -registrator som er forenlig med det øvrige oppsettet.

5.1.5. Forkolonne:

Det anbefales at en egnet forkolonne kobles til analysekolonnen.

5.1.6. Kolonne (eksempel):

Materiale: Rustfritt stål eller glass.

Innvendig diameter: 2–5 mm.

Lengde: 100–250 mm (avhengig av pakkepartikkelstørrelsen), f.eks. 250 mm dersom partiklene har en diameter på 5 µm.

Stasjonærfase: Funksjonelle grupper av alkylamin bundet til silisiumoksid, høyeste partikkelstørrelse 5 µm.

5.1.7. Kromatograferingsvilkår (eksempel):

Elueringsløsning (4.8), strømningshastighet: 1 ml/minutt.

Påvisning: Differensialrefraktometri.

For å sikre at detektoren er helt stabil bør den slås på et par timer før bruk. Referansecellen må fylles med elueringsløsningen.

5.2. Analysevekt med en nøyaktighet på 0,1 mg.

5.3. Filtreringsoppsett for små volumer ved bruk av en 0,45 µm mikromembran.

6. Oppbevaring av prøver

Ved mottak skal prøvene oppbevares ved romtemperatur før analysering.

7. Framgangsmåte

7.1. DEL A: Tillaging av prøve

7.1.1. Rist prøven.

7.1.2. Filtrer prøven gjennom et filter med en porestørrelse på mindre enn eller lik 0,45 µm (5.3).

7.2. DEL B: HPLC

7.2.1. Bestemmelse

Injisjer 10 µl av standardløsningene (4.12) og prøvene (7.1.2). Utfør analysen under egnede kromatograferingsvilkår, f.eks. vilkårene som er beskrevet over.

- 7.2.2. Dersom en prøve har en topp med større areal (eller høyde) enn tilsvarende topp i den mest konsentrerte standardløsningen, bør prøven fortynnes med destillert vann og analyseres på nytt.

8. Beregning

Sammenlign de to kromatogrammene for standardløsningen og den alkoholsterke drikken. Toppene identifiseres ut fra retensjonstiden. Mål arealet (eller høyden) av hver topp for å beregne konsentrasjonene med den eksterne standardmetoden. Det skal tas hensyn til eventuelle fortynninger av prøven.

Det endelige resultatet er summen av sukrose, maltose, laktose, glukose og fruktose uttrykt som invertsukker i g/l.

Invertsukker beregnes som summen av alle monosakkarider og reduserende disakkarider i prøven pluss den støkiometriske mengden glukose og fruktose beregnet ut fra mengden sukrose i prøven.

$$\text{Invertsukker (g/l)} = \text{glukose (g/l)} + \text{fruktose (g/l)} + \text{maltose (g/l)} + \text{laktose (g/l)} + (\text{sukrose (g/l)} \times 1,05).$$

$$1,05 = (\text{molekylvekt av fruktose} + \text{molekylvekt av glukose}) / \text{molekylvekt av sukrose}.$$

9. Metodens robusthet (presisjon)

9.1. Statistiske resultater av analyser foretatt ved flere laboratorier

Følgende opplysninger er hentet fra en internasjonal metodeytelsesundersøkelse foretatt i henhold til internasjonalt anerkjente framgangsmåter⁽¹⁾⁽²⁾.

År for analyse foretatt ved flere laboratorier 2000

Antall laboratorier 24

Antall prøver 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.

Tabell 1

Fruktose, glukose, maltose

Analytt	Fruktose		Glukose			Maltose	
	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Alkoholsterk drikk med anissmak	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Alkoholsterk drikk med anissmak	Standard (10 g/l)
Gjennomsnittsverdi (g/l)	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Antall laboratorier uten avvikende resultater	21	22	21	23	19	21	22
Standardavvik for repeterbarhet, s_r , (g/l)	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analytt	Fruktose		Glukose			Maltose	
	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Alkoholsterk drikk med anissmak	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Alkoholsterk drikk med anissmak	Standard (10 g/l)
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Repeterbarhetsgrense, r (g/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Reproduserbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabell 2

Sukrose

Analytt	Sukrose					
	Pastis	Ouzo	Kirsebærlikør	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (100 g/l)
Gjennomsnittsverdi (g/l)	10,83	29,2 19,7(*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Antall laboratorier uten avvikende resultater	19	19	20	18	18	18
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (g/l)	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Repeterbarhetsgrense, r (g/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Reproduserbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) to nivåer.

Tabell 3

Totalt sukkerinnhold

(Merk: Disse dataene er beregnet for totalt sukkerinnhold og ikke for invertsukker som definert i avsnitt 8 ovenfor).

Prøver	Pastis	Ouzo	Alkoholsterk drikke med anissmak	Kirsebærlikør	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (220 g/l)
Gjennomsnittsverdi (g/l)	10,86	29,2 19,72(*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Antall laboratorier uten avvikende resultater	20	19	20	20	18	18	19
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (g/l)	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Repeterbarhetsgrense, r (g/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (g/l)	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Reproducerbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89»

(*) to nivåer.

4) Nytt kapittel X skal lyde:

«X. **BESTEMMELSE AV FØLGENDE TREFORBINDELSER I ALKOHOLSTERKE DRIKKER VED HJELP AV HØYTRYKKS SVÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC): FURFURAL, 5-HYDROKSYMETYLFURFURAL, 5-METYLFURFURAL, VANILLIN, SYRINGALDEHYD, KONIFERALDEHYD, SINAPALDEHYD, GALLUSSYRE, ELLAGINSYRE, VANILLINSYRE, SYRINGINSYRE OG SKOPOLETIN**

1. **Virkeområde**

Metoden gjelder bestemmelse av furfural, 5-hydroksymetylfurfural, 5-metylfurfural, vanillin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, gallussyre, ellaginsyre, vanillinsyre, syringinsyre og skopoletin med høytrykks svæskromatografi.

2. **Referansestandarder**

Analysemetoder som er anerkjent av Den internasjonale vinorganisasjons (OIV) generalforsamling og offentliggjort av OIV med referansen *OIV-MA-BS-16: R2009*.

3. **Prinsipp**

Bestemmelse med høytrykks svæskromatografi (HPLC) og påvisning med ultrafiolett spektrofotometri ved flere bølgelengder og ved spektrofluorimetri.

4. Reagenser

Reagensene skal ha analysekvalitet. Vannet som brukes, skal enten være destillert vann eller vann med minst tilsvarende renhet. Bruk av mikrofiltrert vann med en motstandsevne på 18,2 M Ω .cm er å foretrekke.

- 4.1. 96 volumprosent alkohol.
- 4.2. Metanol av HPLC-kvalitet (løsemiddel B).
- 4.3. Eddiksyre fortynnet til 0,5 volumprosent (løsemiddel A).
- 4.4. Mobile faser: (bare angitt som eksempel).

Løsemiddel A (0,5 % eddiksyre) og løsemiddel B (ren metanol). Filtrer gjennom et membranfilter (porestørrelse 0,45 μ m). Avgass ved behov i et ultralydbad.

- 4.5. Referansestandarder for en renhet på minst 99 %: Furfural, 5-hydroksymetylfurfural, 5-metylfurfural, vanillin, syringaldehyd, koniferaldehyd, sinapaldehyd, gallussyre, ellaginsyre, vanillinsyre, syringinsyre og skopoletin.
- 4.6. Referanseløsning: Standardstoffene oppløses i en vandig alkoholløsning på 50 volumprosent. De endelige konsentrasjonene i referanseløsningen bør være i størrelsesordenen:

Furfural: 5 mg/l, 5-hydroksymetylfurfural: 10 mg/l, 5-metylfurfural 2 mg/l, vanillin: 5 mg/l, syringaldehyd: 10 mg/l, koniferaldehyd: 5 mg/l, sinapaldehyd: 5 mg/l, gallussyre: 10 mg/l, ellaginsyre: 10 mg/l, vanillinsyre: 5 mg/l, syringinsyre: 5 mg/l, skopoletin: 0,5 mg/l.

5. Utstyr

Standard laboratorieutstyr

- 5.1. Høytrykksvæskerkromatograf som kan fungere med binære gradienter, og som er utstyrt med:
 - 5.1.1. Spektrofotometrisk detektor som kan måle ved bølgelengder fra 260 til 340 nm. Det er imidlertid å foretrekke å arbeide med en detektor med flere bølgelengder med diodearray eller lignende for å bekrefte toppenes renhet.
 - 5.1.2. Spektrofluorimetrisk detektor – eksitasjonsbølgelengde: 354 nm, emisjonsbølgelengde: 446 nm (til bestemmelse av sporstoffer av skopoletin, som også kan påvises ved 313 nm med spektrofotometri).
 - 5.1.3. Injeksjonsutstyr til injeksjon av 10 eller 20 μ l (f.eks.) av prøven.
 - 5.1.4. HPLC-kolonne av typen RP C18, partikkelstørrelse høyst 5 μ m.
- 5.2. Sprøyter til HPLC.
- 5.3. Utstyr til membranfiltrering av små volumer.
- 5.4. Dataintegrator eller -registrator med en ytelse som er forenlig med resten av utstyret, og som særlig må ha flere kanaler for registrering av data.

6. Framgangsmåte

- 6.1. Tillaging av løsningen som skal injiseres

Referanseløsningen og den alkoholsterke drikken filtreres ved behov gjennom et membranfilter med en porediameter på høyst 0,45 μ m.

- 6.2. Kromatografiske driftsvilkår: Analysen utføres ved romtemperatur ved hjelp av utstyret beskrevet i nr. 5.1 og bruk av de mobile fasene (4.4) med en strømningshastighet på cirka 0,6 ml per minutt i samsvar med gradienten nedenfor (bare angitt som eksempel)

Tid: 0 min 50 min 70 min 90 min

Løsemiddel A (vann-syre): 100 % 60 % 100 % 100 %

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

Merk: I visse tilfeller bør denne gradienten endres for å unngå samtidig eluering.

- 6.3. Bestemmelse

- 6.3.1. Injiser referanstandardene separat og deretter blandet.

Tilpass driftsvilkårene slik at oppløsningsfaktorene for alle forbindelsenes topper er minst 1.

- 6.3.2. Injiser prøven tillaget i samsvar med nr. 6.1.

- 6.3.3. Mål arealet av toppene i referanseløsningen og den alkoholsterke drikken og beregn konsentrasjonene.

7. Angivelse av resultater

Konsentrasjonen av hver forbindelse angis i mg/l.

8. Metodens robusthet (nøyaktighet)

Følgende opplysninger er hentet fra en internasjonal metodeytelsesundersøkelse av forskjellige alkoholsterke drikker foretatt i 2009 i henhold til internasjonalt anerkjente framgangsmåter⁽¹⁾⁽²⁾.

- 8.1. Furfural

Analytt	Furfural					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	15	15	15	15	15	15
Antall godkjente resultater (laboratorier)	14	12	13	14	13	13
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analytt	Furfural					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Repetierbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Standardavvik for reproducerbarhet, s_R (mg/l)	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Relativt standardavvik for reproducerbarhet, RSD_R (%)	8	15	5	13	3	5
Reproducerbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-hydroksymetylfurfural

Analytt	5-hydroksymetylfurfural					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	16	16	16	16	16	16
Antall godkjente resultater (laboratorier)	14	14	14	14	14	14
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Repetierbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Standardavvik for reproducerbarhet, s_R (mg/l)	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Relativt standardavvik for reproducerbarhet, RSD_R (%)	8	9	5	13	7	9
Reproducerbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-metylfurfural

Analytt	5-metylfurfural					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	11	11	11	11	11	11
Antall godkjente resultater (laboratorier)	11	11	8	11	10	11
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	35	18	22	39	12	35
Reproducerbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanillin

Analytt	Vanillin					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	16	15	16	16	16	16
Antall godkjente resultater (laboratorier)	16	15	16	16	16	16
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analytt	Vanillin					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	19	25	15	22	13	16
Reproduserbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Syringaldehyd

Analytt	Syringaldehyd					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	16	15	16	16	16	16
Antall godkjente resultater (laboratorier)	13	13	13	12	14	13
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	8	33	5	6	4	4
Reproduserbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Koniferaldehyd

Analytt	Koniferaldehyd					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	13	12	13	12	13	13
Antall godkjente resultater (laboratorier)	12	12	13	12	13	13
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	23	27	21	23	8	19
Reproducerbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinapaldehyd

Analytt	Sinapaldehyd					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	14	14	14	14	15	14
Antall godkjente resultater (laboratorier)	14	13	12	13	13	12
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analytt	Sinapaldehyd					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	31	27	46	13	10	73
Reproduserbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Gallussyre

Analytt	Gallussyre					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Antall laboratorier som deltok	16	15	16	16	16	16
Antall godkjente resultater (laboratorier)	15	14	16	16	16	16
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	36	47	31	53	30	35
Reproduserbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Ellaginsyre

Analytt	Ellaginsyre						
	Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Antall laboratorier som deltok	7	7	7	7	7	7	7
Antall godkjente resultater (laboratorier)	7	7	7	7	7	7	6
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	3,2	1,0	9,5	13	13	13	36
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,95	0,34
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	6,3	16	3,2	3,2	7,4	7,4	1,0
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	2,7	1,0
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	4,9	14
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	44	43	42	39	39	39	40
Reproducerbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	14	40

8.10. Vanillinsyre

Analytt	Vanillinsyre						
	Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Antall laboratorier som deltok	15	15	15	15	15	15	15
Antall godkjente resultater (laboratorier)	12	11	14	14	14	15	14
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	0,2	0,2	1,5	0,8	0,8	2,4	2,7
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,03	0,04	0,03	0,10	0,10	0,13	0,21

Analytt	Vanillinsyre					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	28	20	35	31	51	26
Reproduserbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Syringinsyre

Analytt	Syringinsyre					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	16	15	16	16	16	16
Antall godkjente resultater (laboratorier)	16	15	15	15	16	15
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	19	29	11	18	13	14
Reproduserbarhetsgrense, R (g/l) ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Skopoletin

Analytt	Skopoletin					
	Whisky	Brandy	Rom	Konjakk 1	Bourbon	Konjakk 2
Prøver						
Antall laboratorier som deltok	10	10	10	10	10	10
Antall godkjente resultater (laboratorier)	9	8	9	8	8	8
Gjennomsnittsverdi (mg/l)	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Standardavvik for repeterbarhet, s_r (mg/l)	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Relativt standardavvik for repeterbarhet, RSD_r (%)	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Repeterbarhetsgrense, r (mg/l) ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Standardavvik for reproduserbarhet, s_R (mg/l)	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Relativt standardavvik for reproduserbarhet, RSD_R (%)	15	16	23	17	15	15
Reproduserbarhetsgrense, 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.»