

II

(Ikke-lovgivningsmæssige retsakter)

FORORDNINGER

KOMMISSIONENS GENNEMFØRELSESFORORDNING (EU) 2016/635

af 22. april 2016

om ændring af bilaget til forordning (EF) nr. 2870/2000 for så vidt angår visse referenceanalysemetoder for spiritus

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 110/2008 af 15. januar 2008 om definition, betegnelse, præsentation og mærkning af samt beskyttelse af geografiske betegnelser for spiritus og om ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 1576/89 ⁽¹⁾, særlig artikel 28, stk. 2, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) I Kommissionens forordning (EF) nr. 2870/2000 ⁽²⁾ opstilles og beskrives referenceanalysemetoderne for spiritus. Nogle af metoderne opført i bilaget til den pågældende forordning, herunder metoderne til bestemmelse af indholdet af flygtige syrer og det totale sukkerindhold i spiritus, er imidlertid endnu ikke beskrevet.
- (2) Metoderne til bestemmelse af indholdet af flygtige syrer og det totale sukkerindhold i visse former for spiritus er blevet valideret i to internationale undersøgelser, der blev foretaget efter internationalt anerkendte procedurer, og metodernes kvalitetsparametre er blevet godkendt. Disse undersøgelser blev foretaget som led i et forskningsprojekt under Europa-Kommissionens 4. rammeprogram — programmet vedrørende standarder, måling og prøvning (SMT). Beskrivelsen af disse metoder bør derfor tilføjes i bilaget til forordning (EF) nr. 2870/2000.
- (3) I forordning (EF) nr. 110/2008 fastlægges krav for en række spirituskategorier, der skal lagres på træfade, og det bestemmes, at andre kategorier ligeledes kan lagres på træfade. Det kan være nyttigt at analysere de vigtigste forbindelser fra træ ved vurderingen af, om en prøve er i overensstemmelse med definitionen af den relevante spirituskategori. Den Internationale Vinorganisation (OIV) har anerkendt en analysemetode til bestemmelse af disse forbindelser i sin resolution OIV/OENO 382A/2009. Anerkendelsen af metoden var baseret på data fra en international metodekvalitetsundersøgelse af forskellige spirituskategorier foretaget efter internationalt anerkendte procedurer. Denne metode og beskrivelsen heraf bør derfor føjes til EF-referenceanalysemetoderne for spiritus i bilaget til forordning (EF) nr. 2870/2000.
- (4) Forordning (EF) nr. 2870/2000 bør derfor ændres i overensstemmelse hermed.
- (5) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra Komitéen for Spiritus —

⁽¹⁾ EUT L 39 af 13.2.2008, s. 16.

⁽²⁾ Kommissionens forordning (EF) nr. 2870/2000 af 19. december 2000 om EF-referenceanalysemetoder for spiritus (EFT L 333 af 29.12.2000, s. 20).

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

Bilaget til forordning (EF) nr. 2870/2000 ændres i overensstemmelse med bilaget til denne forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 22. april 2016.

På Kommissionens vegne
Jean-Claude JUNCKER
Formand

BILAG

I bilaget til forordning (EF) nr. 2870/2000 foretages følgende ændringer:

1) I indholdsfortegnelsen foretages følgende ændringer:

a) I punkt III.3 og VIII slettes udtrykket »(p.m.)«.

b) Følgende punkt tilføjes:

»X. Bestemmelse af forbindelser fra træ: furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanillin, syringaldehyd, coniferaldehyd, sinapaldehyd, gallussyre, ellaginsyre, vanillinsyre, syringasyre og scopoletin«.

2) I kapitel III indsættes følgende:

»III.3. BESTEMMELSE AF FLYGTIGE SYRER I SPIRITUS

1. **Anvendelsesområde**

Metoden er blevet valideret i interkalibrering for rom, brandy, druemarc og frugtbrændevin i intervaller fra 30 mg/l til 641 mg/l.

2. **Normative referencer**

ISO 3696: 1987 Vand til analytisk laboratoriebrug. Specifikation og prøvningsmetoder.

3. **Definitioner**

3.1. Indholdet af flygtige syrer beregnes ved at fratrække indholdet af ikke-flygtige syrer fra det totale syreindhold.

3.2. Totalt syreindhold er det totale titreringssyreindhold.

3.3. Indholdet af ikke-flygtige syrer er syreindholdet i indampningsresten efter tørring af spiritussen.

4. **Princip**

Det totale syreindhold og indholdet af ikke-flygtige syrer bestemmes ved titrering eller potentiometri.

5. **Reagenser og materialer**

Under analysen må der kun benyttes reagenser af anerkendt analysekvalitet og vand af mindst klasse 3 if. ISO 3696:1987, medmindre andet er anført.

5.1. 0,01 M natriumhydroxidopløsning (NaOH)

5.2. Indikatorblanding:

0,1 g indigocarmin og 0,1 g phenolrød afvejes.

Opløses i 40 ml vand, og der fyldes op med ethanol til 100 ml.

6. **Apparatur og udstyr**

Indirekte laboratorieudstyr, A-glasudstyr og følgende:

6.1. Vandpumpe

- 6.2. Rotationsfordamper eller ultralydsbad
- 6.3. Udstyr til potentiometrisk titrering (valgfrit)

7. **Prøveudtagning og prøver**

Prøver opbevares ved rumtemperatur inden analysen.

8. **Fremgangsmåde**

8.1. Totalt syreindhold

8.1.1. Fremstilling af prøve

Spiritussen bestråles med ultralyd (sonikering) eller omrøres i to minutter under vakuum for at fjerne kuldioxid, hvis det er nødvendigt.

8.1.2. Titrering

Der afpipetteres 25 ml spiritus i en 500 ml Erlenmeyer-kolbe.

Der tilsættes ca. 200 ml afkølet kogt destilleret vand (fra samme dag) og 2-6 dråber af indikatorblandingen (5.2).

Der titreres med 0,01 M natriumhydroxidopløsning (5.1), indtil den gulgrønne farve ændres til violet i forbindelse med farveløs spiritus, og den gulbrune farve ændres til rødbrun i forbindelse med brunfarvet spiritus.

Titrationen kan også foretages ved potentiometri til pH 7,5.

Antallet af ml tilsat 0,01 M natriumhydroxidopløsning betegnes n_1 .

8.1.3. Beregning

Det totale syreindhold (TA) i milliækvivalenter pr. l spiritus er lig med $0,4 \times n_1$.

Det totale syreindhold (TA') i mg eddikesyre pr. l spiritus er lig med $24 \times n_1$.

8.2. Ikke-flygtige syrer

8.2.1. Fremstilling af prøve

Der inddampes 25 ml spiritus til tørhed:

Der afpipetteres 25 ml spiritus i en fladbundet cylindrisk inddampningsskål med en diameter på 55 mm. I den første time anbringes inddampningsskålen på låget af et kogende vandbad, så væsken ikke koger, hvilket kunne medføre tab ved sprøjt.

Tørringen afsluttes med, at skålen sættes i tørreovn ved 105 °C i 2 timer. Skålen afkøles i eksikator.

8.2.2. Titrering

Inddampningsresten efter inddampningen med afkølet kogt destilleret vand (fra samme dag) opløses, og der fyldes op til ca. 100 ml og tilsættes 2-6 dråber af indikatorblandingen (5.2).

Der titreres med 0,01 M natriumhydroxidopløsning (5.1).

Titreringen kan også foretages ved potentiometri til pH 7,5.

Antallet af ml tilsat 0,01 M natriumhydroxidopløsning betegnes n_2 .

8.2.3. Beregning

Indholdet af ikke-flygtige syrer (FA) i milliækvivalenter pr. l spiritus er lig med $0,4 \times n_2$.

Indholdet af ikke-flygtige syrer (FA) i mg eddikesyre pr. l spiritus er lig med $24 \times n_2$.

9. Beregning af indholdet af flygtige syrer

9.1. Udtrykt i milliækvivalenter pr. l:

Idet:

TA = totalt syreindhold i milliækvivalenter pr. l

FA = indholdet af ikke-flygtige syrer i milliækvivalenter pr. l

Indholdet af flygtige syrer (VA) i milliækvivalenter pr. l er lig med:

$$TA - FA$$

9.2. Udtrykt i mg eddikesyre pr. l:

Idet:

TA' = totalt syreindhold i mg eddikesyre pr. l

FA' = indholdet af ikke-flygtige syrer i mg eddikesyre pr. l

Indholdet af flygtige syrer (VA) i mg eddikesyre pr. l er lig med:

$$TA' - FA'$$

9.3. Udtrykt i g eddikesyre pr. hl ren alkohol (100 % vol.) er lig med: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

hvor A er volumenkoncentration af alkohol i spiritus.

10. Metodens kvalitetsparametre (præcision)

10.1. Statistiske resultater af interkalibrering

Følgende data kommer fra en international metodekvalitetsundersøgelse, der er foretaget efter internationalt anerkendte procedurer [1], [2].

År for interkalibrering 2000

Antal laboratorier 18

Antal prøver 6

Prøver	A	B	C	D	E	F
Antal laboratorier efter eliminering af laboratorier med afvigende resultater	16	18	18	14	18	18
Antal afvigende resultater (laboratorier)	2			4		
Antal accepterede resultater	32	36	36	28	36	36
Gennemsnit [mg/l]	272 (*) 241*	30	591 (*) 641*	46	107	492
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD _r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Repeterbarhedsgænse r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD _R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Reproducerbarhedsgænse R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Prøvetyper:

A blommebrændevin; to niveauer (*)

B rom I; blind dobbeltbestemmelse

C rom II; to niveauer*

D slivovitz; blind dobbeltbestemmelse

E brandy; blind dobbeltbestemmelse

F brændevin af druepresserester; blind dobbeltbestemmelse

[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) Der indsættes følgende som kapitel VIII:

»VIII. TOTALT SUKKERINDHOLD

1. Anvendelsesområde

HPLC-RI finder anvendelse på bestemmelsen af totalt sukkerindhold (udtrykt i invertsukker) i spiritus, bortset fra likører med æg- og mælkeprodukter.

Metoden er blevet valideret i interkalibrering for pastis, destilleret anis, kirsebærlikør, crème de (efterfulgt af navnet på frugten eller den anvendte råvare) og crème de cassis, i intervaller fra 10,86 til 509,7 g/l. Lineariteten af instrumenternes respons blev imidlertid påvist for koncentrationsintervallet fra 2,5 til 20 g/l.

Denne metode er ikke egnet til bestemmelse af lavt sukkerindhold.

2. Normative referencer

ISO 3696: 1987 Vand til analytisk laboratoriebrug. Specifikation og prøvningsmetoder.

3. Princip

Højtryksvæskerkromatografisk analyse af sukkeropløsninger til bestemmelse af deres koncentrationer af glucose, fructose, saccharose, maltose og lactose.

Denne metode omfatter en stationær fase af alkylaminer og detektering ved differentialrefraktometri og er givet som eksempel. Det er ligeledes muligt at anvende ionbytterharpikser som stationær fase.

4. Reagenser og materialer

4.1. Glucose (CAS 50-99-7) med en renhedsgrad på mindst 99 %.

4.2. Fructose (CAS 57-48-7) med en renhedsgrad på mindst 99 %.

4.3. Saccharose (CAS 57-50-1) med en renhedsgrad på mindst 99 %.

4.4. Lactose (CAS 5965-66-2) med en renhedsgrad på mindst 99 %.

4.5. Maltose monohydrat (CAS 6363-53-7) med en renhedsgrad på mindst 99 %.

4.6. Ren acetonitril (CAS 75-05-8) for HPLC-analyse.

4.7. Destilleret eller demineraliseret vand, helst mikrofiltreret.

4.8. Opløsningsmidler (eksempel)

Elueringsvæsken består af:

75 dele (v/v) acetonitril (4.6)

25 dele (v/v) destilleret vand (4.7).

Helium passeret langsomt gennem i 5-10 minutter inden anvendelse med henblik på afgangning.

Er det anvendte vand ikke mikrofiltreret, tilrådes det at filtrere væsken gennem et filter til organiske opløsningsmidler med porestørrelse på ikke over 0,45 µm.

4.9. Ethanol, absolut (CAS 64-17-5).

4.10. Ethanolopløsning (5 %, v/v).

4.11. Fremstilling af standardstamopløsning (20 g/l)

2 g af de enkelte sukkerarter, der skal analyseres (4.1-4.5), afvejes og hældes uden spild i en 100 ml målekolbe. (Bemærk: 2,11 g maltose monohydrat svarer til 2 g maltose).

Der fyldes op til 100 ml med en alkoholopløsning på 5 % vol. (4.10), der omrøres og opbevares ved ca. + 4 °C. Der fremstilles en ny stamopløsning en gang om ugen.

4.12. Fremstilling af arbejdsstandardopløsninger (2,5, 5,0, 7,5, 10 og 20 g/l)

Stamopløsningen på 20 g/l fortyndes (4.11) behørigt med en alkoholopløsning på 5 % vol. (4.10) til fremstilling af fem arbejdsstandardopløsninger på 2,5, 5,0, 7,5, 10 og 20 g/l. Opløsningen filtreres gennem et filter med porestørrelse på ikke over 0,45 µm (5.3).

5. **Apparatur og udstyr**

5.1. HPLC-system til fremstilling af en grundopløsning af alle sukkerarterne.

5.1.1. Højtryksvæskerkromatograf med en seksvejsinjektor med 10 µL loop eller anden automatisk eller manuel anordning til pålidelig injektion af mikromængder.

5.1.2. Pumpesystem, som giver mulighed for at opnå og opretholde en konstant eller programmeret gennemstrømningshastighed med stor nøjagtighed.

5.1.3. Differentialrefraktometer.

5.1.4. Dataintegrator eller -registrator med en ydeevne, som er forenelig med det øvrige system.

5.1.5. Forkolonne:

Det anbefales at knytte en passende forkolonne til den analytiske kolonne.

5.1.6. Kolonne (eksempel):

Materiale: rustfrit stål eller glas.

Indre diameter: 2-5 mm.

Længde: 100-250 mm (afhængigt af pakkepartikelstørrelsen), f.eks. 250 mm, hvis partiklerne har en diameter på 5 µm.

Stationær fase: funktionelle grupper af alkylaminbundet silica, partikelstørrelse maks. 5 µm.

5.1.7. Betingelser for kromatografi (eksempel):

Elueringsvæske (4.8), gennemstrømningshastighed: 1 ml/minut.

Detektering: differentialrefraktometri.

For at sikre, at detektoren er helt stabil, bør den tændes et par timer inden brug. Blindprøven skal opfyldes med elueringsvæsken.

5.2. Analysevægt med nøjagtighed 0,1 mg.

5.3. Filtreringsopstilling til små mængder ved brug af mikromembran på 0,45 µm.

6. **Opbevaring af prøver**

Prøver opbevares ved modtagelsen ved rumtemperatur inden analysen.

7. **Fremgangsmåde**

7.1. DEL A: Forberedelse af prøve

7.1.1. Prøven rystes.

7.1.2. Prøven filtreres gennem et filter med porestørrelse på ikke over 0,45 µm (5.3).

7.2. DEL B: HPLC

7.2.1. Bestemmelse

10 µL af standardopløsningerne (4.12) og prøverne (7.1.2). Analysen foretages under passende betingelser for kromatografi, f.eks. de oven for beskrevne betingelser.

- 7.2.2. Hvis arealet (eller højden) af en top i en prøve er større end den tilsvarende top i den mest koncentrerede standard, bør prøven fortyndes med destilleret vand og analyseres på ny.

8. Beregning

De to opnåede kromatogrammer for standardopløsningen og spiritussen sammenlignes. Toppene identificeres ud fra retentionstiden. Højden (eller arealet) af hver top måles for at beregne koncentrationerne ved anvendelse af ekstern standard. Der tages højde for eventuelle fortyndinger af prøven.

Det endelige resultat er summen af saccharose, maltose, lactose, glucose og fructose i g/l invertsukker.

Indholdet af invertsukker beregnes som summen af alle monosaccharider og ved at reducere indholdet af disaccharider plus den støkiometriske mængde af glucose og fructose beregnet på grundlag af indholdet af saccharose.

$$\begin{aligned} \text{Invertsukker (g/l)} &= \text{glucose (g/l)} + \text{fructose (g/l)} + \text{maltose (g/l)} + \text{lactose (g/l)} + (\text{saccharose (g/l)} \times 1,05) \\ 1,05 &= (\text{molekylvægt, fructose} + \text{molekylvægt, glucose}) / \text{molekylvægt, saccharose} \end{aligned}$$

9. Metodens kvalitetsparametre (præcision)

9.1. Statistiske resultater af interkalibrering

Følgende data kommer fra en international metodekvalitetsundersøgelse, der er foretaget efter internationalt anerkendte procedurer [1], [2].

År for interkalibrering 2000

Antal laboratorier 24

Antal 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.

Tabel 1

Fruktose, glukose, maltose

Analysand	Fruktose		Glukose			Maltose	
Prøver (× 2)	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Spiritus med anissmag	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Spiritus med anissmag	Standard (10 g/l)
Gennemsnit [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Antal laboratorier uden afvigende resultater	21	22	21	23	19	21	22
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analysand	Fruktose		Glukose			Maltose	
Prøver (× 2)	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Spiritus med anissmag	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Spiritus med anissmag	Standard (10 g/l)
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Repeterbarhedsgrænse r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tabel 2

Saccharose

Analysand	Saccharose					
Prøver	Pastis	Ouzo	Kirsebærlikør	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (100 g/l)
Gennemsnit [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Antal laboratorier uden afvigende resultater	19	19	20	18	18	18
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Repeterbarhedsgrænse r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) to niveauer

Tabel 3

Totalt sukkerindhold

(Bemærk: Disse data er beregnet for totalt sukkerindhold og ikke for invertsukker som defineret i punkt 8 ovenfor.)

Prøver	Pastis	Ouzo	Spiritus med anissmag	Kirsebær-likør	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (220 g/l)
Gennemsnit [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Antal laboratorier uden afvigende resultater	20	19	20	20	18	18	19
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Repeterbarhedsgrænse r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) to niveauer.

4) Følgende indsættes som kapitel X:

»X. **BESTEMMELSE AF FØLGENDE FORBINDELSER FRA TRÆ I SPIRITUS VED HØJTRYKSVÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC): FURFURAL, 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL, 5-METHYLFURFURAL, VANILLIN, SYRINGALDEHYD, CONIFERALDEHYD, SINAPALDEHYD, GALLUSSYRE, ELLAGINSYRE, VANILLINSYRE, SYRINGASYRE OG SCOPOLETIN**

1. **Anvendelsesområde**

Metoden vedrører bestemmelse af furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanillin, syringaldehyd, coniferaldehyd, sinapaldehyd, gallussyre, ellaginsyre, vanillinsyre, syringasyre og scopoletin ved højtryksvæskerkromatografi.

2. **Normativ reference**

Analysemetode, der er godkendt af Den Internationale Vinorganisations (OIV) generalforsamling og offentliggjort af OIV under reference OIV-MA-BS-16: R2009.

3. **Princip**

Bestemmelse ved højtryksvæskerkromatografi (HPLC) med detektering ved ultraviolet spektrofotometri ved flere bølgelængder og ved spektrofluorimetri.

4. Reagenser

Reagenserne skal være af analysekvalitet. Der anvendes destilleret vand eller vand af mindst tilsvarende renhed. Det er bedst at anvende mikrofiltreret vand med en resistivitet på 18,2 M Ω .cm.

4.1. Alkoholindhold på 96 %.

4.2. Methanol af HPLC-kvalitet (væske B).

4.3. 0,5 % eddikesyre (væske A).

4.4. Mobile faser: (er kun givet som eksempel).

Væske A (0,5 % eddikesyre) og væske B (ren methanol). Filtreres gennem et membranfilter (porestørrelse 0,45 μ m). Der afgasses om nødvendigt i ultralydsbad.

4.5. Referencestandarder for en renhed på mindst 99 %: furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 5-methylfurfural, vanillin, syringaldehyd, coniferaldehyd, sinapaldehyd, gallussyre, ellaginsyre, vanillinsyre, syringasyre og scopoletin.

4.6. Referenceopløsning: Standardstofferne opløses i en vandig-alkoholholdig opløsning på 50 % vol. De endelige koncentrationer i referenceopløsningen bør være i størrelsesordenen:

furfural: 5 mg/l; 5-hydroxymethyl furfural: 10 mg/l; 5-methylfurfural 2 mg/l; vanillin: 5 mg/l; syringaldehyd: 10 mg/l; coniferaldehyd: 5 mg/l; sinapaldehyd: 5 mg/l; gallussyre: 10 mg/l; ellaginsyre: 10 mg/l; vanillinsyre: 5 mg/l; syringasyre: 5 mg/l; scopoletin: 0,5 mg/l.

5. Apparatur

Sædvanligt laboratorieudstyr

5.1. Højtryksvæskeskromatograf, der kan fungere i binær gradient mode, udstyret med:

5.1.1. Spektrofotometrisk detektor til måling af bølgelængder i intervallet 260-340 nm. Det er imidlertid bedst at arbejde med en detektor med variabel bølgelængde med en diode eller lignende med henblik på at bekræfte toppenes renhed.

5.1.2. Spektrofotometrisk detektor — excitationbølgelængde: 354 nm, emissionsbølgelængde: 446 nm (til detektering af scopoletin, der ligeledes kan detekteres ved 313 nm ved spektrofotometri).

5.1.3. Injektionsanordning til injektion af 10 eller 20 μ l (f.eks.) af prøven.

5.1.4. Kolonne til højtryksvæskeskromatografi af typen RP C18, partikelstørrelse maks. 5 μ m.

5.2. Sprøjter til HPLC.

5.3. Anordning til membranfiltrering af små mængder.

5.4. Computer/integrator eller optager/integrator, der er kompatibel med hele apparaturet. Den skal navnlig have flere indsamlingskanaler.

6. Fremgangsmåde

6.1. Fremstilling af injektionsopløsningen.

Referenceopløsningen og spiritussen filtreres om nødvendigt gennem et membranfilter med porestørrelse på ikke over 0,45 μ m.

- 6.2. Kromatografiske driftsbetingelser: Analysen foretages ved stuetemperatur ved hjælp af det udstyr, der er beskrevet i punkt 5.1, og ved brug af de mobile faser (punkt 4.4) og en gennemstrømningshastighed på ca. 0,6 ml pr. minut i overensstemmelse med nedenstående gradient (er kun givet som et eksempel)

Tidspunkt: 0 min, 50 min, 70 min, 90 min

Væske A (vand-syre): 100 %, 60 %, 100 %, 100 %

Væske B (methanol): 0 %, 40 %, 0 %, 0 %

Bemærk, at denne gradient bør ændres i nogle tilfælde for at undgå co-eluering.

6.3. Bestemmelse

6.3.1. Referencestandarderne sprøjtes ind særskilt og blandes.

Tilpas driftsbetingelserne, således at opløsningsfaktorerne for alle forbindelsernes toppe mindst svarer til 1.

6.3.2. Prøven fremstillet i overensstemmelse med punkt 6.1 indsprøjtes.

6.3.3. Arealet af toppene i referenceopløsningen og spiritussen måles, og koncentrationerne beregnes.

7. Angivelse af resultater

Koncentrationen af hver bestanddel udtrykkes i mg/l.

8. Metodens kvalitetsparametre (præcision)

Følgende data kommer fra en international metodekvalitetsundersøgelse af forskellige spirituskategorier foretaget i 2009 efter internationalt anerkendte procedurer [1], [2].

8.1. Furfural

Analysand	Furfural					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	15	15	15	15	15	15
Antal accepterede resultater (laboratorier)	14	12	13	14	13	13
Gennemsnit [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analysand	Furfural					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	8	15	5	13	3	5
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-hydroxymethylfurfural

Analysand	5-hydroxymethylfurfural					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	16	16	16	16	16	16
Antal accepterede resultater (laboratorier)	14	14	14	14	14	14
Gennemsnit [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-methylfurfural

Analysand	5-methylfurfural					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	11	11	11	11	11	11
Antal accepterede resultater (laboratorier)	11	11	8	11	10	11
Gennemsnit [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Repeterbarhedsgrense r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Reproducerbarhedsgrense R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanillin

Analysand	Vanillin					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	16	15	16	16	16	16
Antal accepterede resultater (laboratorier)	16	15	16	16	16	16
Gennemsnit [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analysand	Vanillin					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Syringaldehyd

Analysand	Syringaldehyd					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	16	15	16	16	16	16
Antal accepterede resultater (laboratorier)	13	13	13	12	14	13
Gennemsnit [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Coniferaldehyd

Analysand	Coniferaldehyd					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	13	12	13	12	13	13
Antal accepterede resultater (laboratorier)	12	12	13	12	13	13
Gennemsnit [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinapaldehyd

Analysand	Sinapaldehyd					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	14	14	14	14	15	14
Antal accepterede resultater (laboratorier)	14	13	12	13	13	12
Gennemsnit [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analysand	Sinapaldehyd					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Gallussyre

Analysand	Gallussyre					
Prøve	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	16	15	16	16	16	16
Antal accepterede resultater (laboratorier)	15	14	16	16	16	16
Gennemsnit [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Ellaginsyre

Analysand	Ellaginsyre					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	7	7	7	7	7	7
Antal accepterede resultater (laboratorier)	7	7	7	7	7	6
Gennemsnit [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Vanillinsyre

Analysand	Vanillinsyre					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	15	15	15	15	15	15
Antal accepterede resultater (laboratorier)	12	11	14	14	15	14
Gennemsnit [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analysand	Vanillinsyre					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Syringasyre

Analysand	Syringasyre					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	16	15	16	16	16	16
Antal accepterede resultater (laboratorier)	16	15	15	15	16	15
Gennemsnit [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Reproducerbarhedsgrænse R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Scopoletin

Analysand	Scopoletin					
Prøver	Whisky	Brandy	Rom	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Antal deltagende laboratorier	10	10	10	10	10	10
Antal accepterede resultater (laboratorier)	9	8	9	8	8	8
Gennemsnit [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Standardafvigelse for repeterbarhed s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Relativ standardafvigelse for repeterbarhed RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Repeterbarhedsgrænse r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Standardafvigelse for reproducerbarhed s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Relativ standardafvigelse for reproducerbarhed RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Reproducerbarhedsgrænse 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.«