

II

(Muud kui seadusandlikud aktid)

MÄÄRUSED

KOMISJONI RAKENDUSMÄÄRUS (EL) 2016/635,

22. aprill 2016,

millega muudetakse määruse (EÜ) nr 2870/2000 lisa piiritusjookide analüüsimise teatavate standardmeetodite osas

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 15. jaanuari 2008. aasta määrust (EÜ) nr 110/2008 piiritusjookide määramise, kirjeldamise, esitlemise, märgistamise ja geograafiliste tähistega kaitse kohta ning millega tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 1576/89, (⁽¹⁾) eelkõige selle artikli 28 lõiget 2,

ning arvestades järgmist:

- (1) Komisjoni määruses (EÜ) nr 2870/2000 (⁽²⁾) on loetletud standardmeetodid piiritusjookide analüüsimiseks ning esitatud nende kirjeldus. Teatavaid kõnealuse määruse lisas loetletud meetodeid, mille hulka kuuluvad piiritusjookide lenduvate hapete määramise meetod ja kogusuhkru sisalduse määramise meetod, ei ole siiski veel kirjeldatud.
- (2) Meetodid, millega määratakse kindlaks lenduvate hapete ja kogusuhkru sisaldus teatavates piiritusjookides, esitati kaheks rahvusvaheliseks valideerimisuuringuks, mis toimusid vastavalt rahvusvaheliselt kokku lepitud korrale, ning mõlema meetodi tulemuslikkuse näitajad tunnistati vastuvõetavaks. Uuringud tehti Euroopa Komisjoni standardeid, mõõtmisi ja katseid hõlmava IV raamprogrammi uurimisprojekti osana. Seepärast tuleks kõnealuste meetodite kirjeldus lisada määruse (EÜ) nr 2870/2000 lisasse.
- (3) Määrusega (EÜ) nr 110/2008 on kehtestatud nõuded seoses teatavate piiritusjookide kategooriatega, mille puhul jook peab laagerduma puidust anumates, samuti on nähtud ette, et ka muid jooke võib sel viisil laagerdada. Puidust lisandunud oluliste koostisosade analüüsist võib olla abi, kui on vaja otsustada, kas proov vastab asjaomase piiritusjooki kategooria määratlusele. Rahvusvaheline Viinamarja- ja Veiniorganisatsioon (OIV) on kõnealuste koostisainete määramise analüüsi meetodi heaks kiitnud oma resolutsioonis OIV/OENO 382A/2009. Meetodi heakskiitmine põhines andmetel, mis saadi vastavalt rahvusvaheliselt kokku lepitud korrale tehtud meetodi suutlikkuse rahvusvahelise uuringu põhjal, mis hõlmas eri piiritusjooke. Seepärast tuleks kõnealune meetod ja selle kirjeldus lisada määruse (EÜ) nr 2870/2000 lisas esitatud liidu piiritusjookide analüüsimise standardmeetodite hulka.
- (4) Seepärast tuleks määrust (EÜ) nr 2870/2000 vastavalt muuta.
- (5) Käesolevas määruses ette nähtud meetmed on kooskõlas piiritusjoogituru komitee arvamusega,

(⁽¹⁾) ELT L 39, 13.2.2008, lk 16.

(⁽²⁾) Komisjoni 19. detsembri 2000. aasta määrus (EÜ) nr 2870/2000, millega sätestatakse ühenduse standardmeetodid piiritusjookide analüüsimiseks (EÜT L 333, 29.12.2000, lk 20).

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määruse (EÜ) nr 2870/2000 lisa muudetakse vastavalt käesoleva määruse lisale.

Artikkel 2

Käesolev määrus jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 22. aprill 2016

Komisjoni nimel
president
Jean-Claude JUNCKER

LISA

Määruse (EÜ) nr 2870/2000 lisa muudetakse järgmiselt.

1) Sisukorda muudetakse järgmiselt:

a) punktides III.3 ja VIII jäetakse välja lühend „(p.m.)“;

b) lisatakse järgmine punkt:

„X. Puidust pärinevate ühendite määramine: furfuraal, 5-hüdroksümetüülfurfuraal, 5-metüülfurfuraal, vanilliin, sirelaldehüüd, koniferüülaldehüüd, sinepaldehüüd, gallushape, ellaghape, vanilliinhape, sirelhape ja skopoletiin.“

2) III peatükki lisatakse järgmine punkt:

„III.3. LENDUVATE HAPETE MÄÄRAMINE PIIRITUSJOOKIDES

1. **Kohaldamisala**

Käesolev meetod on valideeritud rummi, *brandy*, viinamarjade pressimisjääkidest valmistatud kange alkohoolse joogi ja puuviljadest valmistatud kange alkohoolse joogi laboritevahelisel katsel, kontsentratsioonivahemikus 30 mg/l kuni 641 mg/l.

2. **Viited normidele**

ISO 3696:1987 Vesi analüütiliseks kasutamiseks – Spetsifikatsioon ja katsemeetodid.

3. **Mõisted**

3.1. Lenduvate hapete sisalduse arvutamiseks lahutatakse mittelenduvate hapete sisaldus üldhappesusest.

3.2. Üldhappesus on tiitritavate hapete summa.

3.3. Mittelenduvad happed on pärast kange alkohoolse joogi kuivamiseni aurustamist järele jäänud jäägi happesus.

4. **Põhimõte**

Üldhappesus ja mittelenduvate hapete sisaldus määratakse tiitrimisega või potentsiomeetriliselt.

5. **Reaktiivid ja materjalid**

Kui ei ole öeldud teisiti, kasutatakse analüüsimisel üksnes analüütiliselt puhtaid reaktiive ja vähemalt 3. puhtusastme vett, mis vastab ISO 3696:1987 nõuetele.

5.1. 0,01 M naatriumhüdroksiidi lahus (NaOH)

5.2. Segaindikaatorlahus:

kaalutakse 0,1 grammi indigokarmiini ja 0,1 grammi fenoolpunast;

lahustatakse 40 ml vees ja täidetakse etanooliga 100 ml margini.

6. **Seadmed ja aparatuur**

Tavalised laboriseadmed, gradueeritud ja A-kategooriasse kuuluvad klaasnõud ja järgmised seadmed.

6.1. Veepump

6.2. Rotaatoraurusti või ultrahelivann

6.3. Potentsiomeetrilise tiitrimise seadmed (valikuline)

7. Proovivõtmine ja proovid

Proove hoitakse kuni analüüsimiseni toatemperatuuril.

8. Määramise käik

8.1. Üldhappesus

8.1.1. Proovi ettevalmistamine

Kanget alkoholset jooki töödeldakse ultraheliga või segatakse kaks minutit vaakumis, et eralduks süsinikdioksiid, kui seda nõutakse.

8.1.2. Tiitrimine

25 ml piiritusjooki viiakse pipetiga 500 ml Erlenmeyeri kolbi.

Lisatakse ligikaudu 200 ml jahutatud keedetud destilleeritud vett (värske, valmistatud samal päeval) ja 2–6 tilka segaindikaatorlahust (5.2).

Tiitritakse 0,01 M naatriumhüdroksiidi lahusega (5.1), kuni värvusetu kange alkoholse joogi puhul muutub kollakasroheline värvus lillaks ja pruuni värvusega kange alkoholse joogi puhul kollakaspruun värvus punakaspruuniks.

Tiitrida võib ka potentsiomeetriliselt, kuni pH väärtuseni 7,5.

Loeme, et lisati n_1 ml 0,01 M naatriumhüdroksiidi.

8.1.3. Arvutamine

Üldhappesus (*total acidity*, TA), väljendatuna milliekvivalentides liitri kange alkoholse joogi kohta, on $0,4 \times n_1$.

Üldhappesus (TA'), väljendatuna äädikhappe milligrammides liitri kange alkoholse joogi kohta, on $24 \times n_1$.

8.2. Mittelenduvate hapete sisaldus

8.2.1. Proovi ettevalmistamine

25 ml kanget alkoholset jooki aurutatakse kuivaks.

25 ml kanget alkoholset jooki viiakse pipetiga 55 mm diameetriga lamedapõhjalisse silindrilisse aurustuskaussi. Esimese aurustamistunni jooksul asetatakse aurustuskauss keeva vee vanni kaanele nii, et vedelik ei keeks, kuna keemine võib põhjustada pritsimiskadusid.

Kuivatamise lõpuleviimiseks asetatakse aurustuskauss kaheks tunniks kuivatuskappi temperatuurile 105 °C. Aurustuskaasil lastakse eksikaatoris jahtuda.

8.2.2. Tiitrimine

Aurustamisjäák lahustatakse jahutatud keedetud destilleeritud veega (värske, valmistatud samal päeval) ja täiendatakse ligikaudu 100 milliliitrit, lisatakse 2–6 tilka segaindikaatorlahust (5.2).

Tiitritakse 0,01 M naatriumhüdroksiidi lahusega (5.1).

Tiitrida võib ka potentsiomeetriliselt, kuni pH väärtuseni 7,5.

Loeme, et lisati n_2 ml 0,01 M naatriumhüdroksiidi.

8.2.3. Arvutamine

Mittelenduvate hapete sisaldus (*fixed acidity*, FA), väljendatuna milliekvivalentides liitri kange alkoholse joogi kohta, on $0,4 \times n_2$.

Mittelenduvate hapete sisaldus (FA), väljendatuna äädikhappe milligrammides liitri kange alkoholse joogi kohta, on $24 \times n_2$.

9. Lenduvate hapete sisalduse arvutamine

9.1. Väljendatuna milliekvivalentides liitri kohta

Kasutatakse järgmisi tähiseid:

TA = üldhappesus milliekvivalentides liitri kohta

FA = mittelenduvate hapete sisaldus milliekvivalentides liitri kohta

Lenduvate hapete sisaldus (*volatile acidity*, VA), milliekvivalentides liitri kohta:

$$TA - FA$$

9.2. Väljendatuna äädikhappe milligrammides liitri kohta

Kasutatakse järgmisi tähiseid:

TA' = üldhappesus äädikhappe milligrammides liitri kohta

FA' = mittelenduvate hapete sisaldus äädikhappe milligrammides liitri kohta

Lenduvate hapete sisaldus, VA, äädikhappe milligrammides liitri kohta on:

$$TA' - FA'$$

9.3. Väljendatuna äädikhappe grammides ühe hektoliitri 100-mahuprotsendilise puhta alkoholi kohta: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

kus A on piiritusjoogi alkoholisisaldus mahuprotsentides.

10. Meetodi suutlikkuse näitajad (täpsus)

10.1. Laboritevahelise katse statistilised tulemused

Vastavalt rahvusvaheliselt kokku lepitud eeskirjadele [1] [2] tehtud meetodi suutlikkuse rahvusvahelise uuringu põhjal saadi järgmised andmed.

Laboritevahelise katse tegemise aasta: 2000

Laborite arv 18

Proovide arv 6

Proovid	A	B	C	D	E	F
Väljavalitud laborite arv pärast võõrväärtuste elimineerimist	16	18	18	14	18	18
Võõrväärtuste arv (laborid)	2			4		
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv	32	36	36	28	36	36
Keskvärtus ($\bar{x}$) [mg/l]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Korratavuse suhteline standardhälve RSD _r [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Korratavuse piirnorm r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD _R [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Reprodutseeritavuse piirnorm r [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Proovide liigid:

A Ploomidest valmistatud kange alkoholne jook; jaotustase *

B Rumm I; tühikatse kordusproovid

C Rumm II; jaotustase *

D Slivovitz; tühikatse kordusproovid

E Brandy; tühikatse kordusproovid

F Viinamarjade pressimisjääkidest valmistatud kange alkoholne jook; tühikatse kordusproovid

[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) Lisatakse alljärgnev VIII peatükk:

„VIII. KOGUSUHKUR

1. Kohaldamisala

HPLC-RI meetodit kasutatakse kogusuhkru (väljendatuna invertisuhkruna) määramiseks piiritusjookides, välja arvatud muna ja piimatooteid sisaldavad liköörid.

Meetod on valideeritud *pastis*'i, destilleeritud *anis*'i, kirsilikööri, *crème de* (millele järgneb kasutatud puuvilja või tooraine nimetus) ja *Crème de Cassis*'i laboritevahelisel katsel, kontsentratsioonivahemikus 10,86–509,7 g/l. Seadme näidu lineaarsust kontrolliti kontsentratsioonivahemikus 2,5–20,0 g/l.

Kõnealune meetod ei ole ette nähtud suhkru vähese sisalduse määramiseks.

2. Viited normidele

ISO 3696:1987 Vesi analüütiliseks kasutamiseks – Spetsifikatsioon ja katsemeetodid.

3. Põhimõte

Suhkrulahuseid analüüsitakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil, et määrata kindlaks nende glükoosi, fruktoosi, sahharoosi, maltoosi ja laktoosi kontsentratsioon.

Osutatud meetod on esitatud näitena; selle puhul kasutatakse statsionaarset alküülamiinifaasi ja diferentsiaal-refraktomeetrilist detektorit. Statsionaarse faasina oleks samuti võimalik kasutada anioonivahetusvaiku.

4. Reaktiivid ja materjalid

4.1. Glükoos (CAS 50-99-7), puhtusega vähemalt 99 %.

4.2. Fruktoos (CAS 57-48-7), puhtusega vähemalt 99 %.

4.3. Sahharoos (CAS 57-50-1), puhtusega vähemalt 99 %.

4.4. Laktoos (CAS 5965-66-2), puhtusega vähemalt 99 %.

4.5. Maltoosmonohüdraat (CAS 6363-53-7), puhtusega vähemalt 99 %.

4.6. Puhas atsetonitriil (CAS 75-05-8) HPLC analüüsi jaoks.

4.7. Destilleeritud või demineraliseeritud vesi, eelistatavalt mikrofiltritud.

4.8. Lahustid (näide)

Eluendi koostis on järgmine:

75 mahuosa atsetonitriili (4.6),

25 mahuosa destilleeritud vett (4.7).

Enne kasutamist eluent degaseeritakse; selleks juhitakse eluendist aeglase vooluna 5–10 minuti jooksul läbi heeliumi.

Kui kasutatavat vett ei ole mikrofiltritud, tuleks eluent filtrida orgaaniliste lahustite filtriga, mille poori suurus on kuni 0,45 µm.

4.9. Absoluutne etanool (CAS 64-17-5)

4.10. Etanoolilahus (5 %, v/v).

4.11. Standardpõhilahuse (20 g/l) valmistamine

Kaalutakse 2 g analüüsitavat suhkrut (4.1–4.5) ja viiakse ilma kadudeta üle 100 ml mõõtekolbi. (NB! 2 g maltoosile vastab 2,11 g maltoosmonohüdraati.)

Täiendatakse kuni 100 ml-ni 5-mahuprotsendilise alkoholilahusega (4.10), loksutatakse ja säilitatakse temperatuuril üle + 4 °C. Uus põhilahus valmistatakse kord nädalas.

4.12. Standardtöölahuste (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ja 20,0 g/l) valmistamine

Põhilahust (20 g/l) lahjendatakse sobivas vahekorras 5-mahuprotsendilise alkoholilahusega (4.10), et saada viis standardtöölahust (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ja 20,0 g/l). Filtritakse filtriga, mille poori suurus on kuni 0,45 µm (5.3).

5. Seadmed ja aparatuur

- 5.1. Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) süsteem, mille abil on võimalik saavutada kõikide suhkrute lahutumist kuni nulljooneni.
- 5.1.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograaf, millel on kuuekäiguline injektsiooniventiil, mille sisestussilmus on 10 µl, või mis tahes muu automaatne või manuaalne seade mikrokoguste täpselt sissesüstimiseks.
- 5.1.2. Pumbasüsteem, mis võimaldab saavutada ja hoida püsivat või programmeeritud voolukiirust suure täpsusega.
- 5.1.3. Diferentsiaalrefraktomeeter.
- 5.1.4. Integreeriv arvutisüsteem või isekirjutaja, mille tase vastab ülejäänud seadmete tasemele.
- 5.1.5. Eelkolonn

Analüütilisele kolonnile soovitatakse lisada sobiv eelkolonn.

5.1.6. Kolonn (näide):

Materjal:	roostevaba teras või klaas
Siseläbimõõt:	2–5 mm.
Pikkus:	100–250 mm (sõltuvalt pakendi osakeste suurusest), näiteks 250 mm, kui osakeste läbimõõt on 5 µm.
Statsionaarne faas:	ränidioksiidiga seotud alküülamiinfunktsionaalrühmad, osakeste suurus kuni 5 µm.

5.1.7. Kromatograferimistingimused (näide):

Eluent (4.8), voolukiirus: 1 milliliiter minutis.

Tuvastamine: diferentsiaalrefraktomeetria.

Detektori täieliku stabiilsuse tagamiseks tuleks see sisse lülitada paar tundi enne kasutamist. Võrdlusküvett tuleb täita eluendiga.

- 5.2. Analüütilised kaalud täpsusega 0,1 mg.
- 5.3. Seade väikeste lahusekoguste filtrimiseks, milles kasutatakse mikromembraane 0,45 µm.

6. Proovi säilitamine

Pärast kättesaamist säilitatakse proove kuni analüüsimiseni toatemperatuuril.

7. Määramise käik

7.1. A OSA: proovi ettevalmistamine

- 7.1.1. Proovi loksutatakse.
- 7.1.2. Proov filtritakse läbi filtri, mille poori suurus on kuni 0,45 µm (5.3).

7.2. B OSA: HPLC

7.2.1. Määramine

Kolonnist süstitakse 10 µl standardlahuseid (4.12) ja proove (7.1.2). Tehakse analüüs sobivatel kromatograafilistel tingimustel, näiteks nagu eespool kirjeldatud.

- 7.2.2. Kui proovi mõne piigi pindala (või kõrgus) on suurem kui vastava piigi kõige kontsentreeritum standard, tuleb proovi lahjendada destilleeritud veega ja teha kordusanalüüs.

8. Arvutamine

Võrreldakse kaht kromatogrammi, mis on saadud standardlahuse ja kange alkohoolse joogiga. Piigid määratakse nende retentsioonaja järgi. Mõõdetakse iga piigi pindala (või kõrgus) ja arvutatakse välisstandardi meetodi abil suhkru kontsentratsioon. Arvesse võetakse proovi kõiki lahjendamisi.

Lõpptulemuseks on sahharoosi, maltoosi, laktoosi, glükoosi ja fruktoosi summa, väljendatuna invertsuhkruna (g/l).

Invertsuhkrusisaldus arvutatakse proovis sisalduvate monosahhariidide ja taandavate disahhariidide summana, millele lisatakse glükoosi ja fruktoosi stöhhiomeetrilised kogused, mis arvutatakse olemasolevast sahharoosisisaldusest.

$$\begin{aligned} \text{Invertsuhkur (g/l)} &= \text{glükoos (g/l)} + \text{fruktoos (g/l)} + \text{maltoos (g/l)} + \text{laktoos (g/l)} + (\text{sahharoos (g/l)} \times 1,05) \\ 1,05 &= (\text{fruktoosi molekulmass} + \text{glükoosi molekulmass}) / \text{sahharoosi molekulmass} \end{aligned}$$

9. Meetodi suutlikkuse näitajad (täpsus)

9.1. Laboritevahelise katse statistilised tulemused

Vastavalt rahvusvaheliselt kokku lepitud eeskirjadele [1] [2] tehtud meetodi suutlikkuse rahvusvahelise uuringu põhjal saadi järgmised andmed.

Laboritevahelise katse tegemise aasta: 2000

Laborite arv 24

Proovide arv 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

Fruktoos, glükoos, maltoos

Analüüt	Fruktoos		Glükoos			Maltoos	
Proovid (2 proovi)	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Aniisimaitsetelised piiritusjoogid	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Aniisimaitsetelised piiritusjoogid	Standard (10 g/l)
Keskväärtus [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Laborite arv (ilma võõrväärtusteta)	21	22	21	23	19	21	22
Korratavuse standardhälve s_r [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analüüt	Fruktoos		Glükoos			Maltoos	
Proovid (2 proovi)	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Aniisimait-selised piiritusjoogid	Crème de Cassis	Standard (50 g/l)	Aniisimait-selised piiritusjoogid	Standard (10 g/l)
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Korratavuse piirnorm r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Reprodutseeritavuse piirnorm 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

Sahharoos

Analüüt	Sahharoos					
Proovid	Pastis	Ouzo	Cherry liqueur	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (100 g/l)
Keskväärtus [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Laborite arv (ilma võõrväärtusteta)	19	19	20	18	18	18
Korratavuse standardhälve s_r [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Korratavuse piirnorm r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(*) jaotustase

Tabel 3

Kogusuhkur

(Märkus: kõnealused andmed arvutati kogusuhkru kohta, mitte invertsuhkru kohta, nagu on määratletud eespool 8. punktis.)

Proovid	Pastis	Ouzo	Aniisimait- selised piiri- tusjoogid	Cherry liqueur	Crème de Menthe	Crème de Cassis	Standard (220 g/l)
Keskvärtus [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Laborite arv (ilma võõrväär- tusteta)	20	19	20	20	18	18	19
Korratavuse standardhälve s_r [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Korratavuse suhteline stan- dardhälve RSD_r [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Korratavuse piirnorm r [g/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Reprodutseeritavuse stan- dardhälve s_R [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Reprodutseeritavuse suhte- line standardhälve RSD_R [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Reprodutseeritavuse piir- norm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(*) jaotustase“

4) Lisatakse järgmine X peatükk:

„X. **PIIRITUSJOOKIDES KÕRGEFEKTIIVSE VEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) ABIL JÄRGMISTE PUIDUST PÄRINEVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE: FURFURAAL, 5-HÜDROKSÜMETÜÜLFURFURAAL, 5-METÜÜLFURFURAAL, VANILLIN, SIRELALDEHÜÜD, KONIFERÜÜLALDEHÜÜD, SINEPALDEHÜÜD, GALLUSHAPE, ELLAGHAPE, VANILLIINHAPE, SIRELHAPE JA SKOPOLEITIIN**

1. Kohaldamisala

Kõnealune meetod on ette nähtud furfuraali, 5-hüdroksümetüülfurfuraali, 5-metüülfurfuraali, vanilliini, sirelaldehüüdi, koniferüülaldehüüdi, sinpalaldehüüdi; gallushappe, ellaghappe, vanillinhappe, sirelhappe ja skopoletiini määramiseks kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil.

2. Viited normidele

Analüüsimeetod, mida on tunnustatud Rahvusvahelise Viinamarja- ja Veiniorganisatsiooni (OIV) peaassamblee ja mis on avaldatud Rahvusvahelise Viinamarja- ja Veiniorganisatsiooni poolt viite OIV-MA-BS-16: R2009 all.

3. Põhimõte

Määramine kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, piikide tuvastamiseks kasutatakse UV-spektrofotomeetriaat mitmel lainepikkusel ja spektrofotomeetriaat.

4. Reagentid

Reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega vett. Soovitav on kasutada mikrofiltritud vett, mille eritakistus on 18,2 M Ω . cm.

- 4.1. 96-mahuprotsendiline alkohol.
- 4.2. HPLC-kvaliteediga metanool (lahusti B).
- 4.3. 0,5 mahuprotsendini lahjendatud äädikhape (lahusti A).
- 4.4. Liikuvad faasid: (esitatud vaid näitena).

Lahusti A (0,5 % äädikhape) ja lahusti B (puhas metanool). Filtritakse läbi membraanfiltr (0,45 μ m). Degaseeritakse vajaduse korral ultrahelivannis.

- 4.5. Võrdlusstandardid, puhtus vähemalt 99 %: furfuraal, 5-hüdroksümetüülfurfuraal, 5-metüülfurfuraal, vanilliin, sirelaldehüüd, koniferüülaldehüüd, sinepaldehüüd; gallushape, ellaghape, vanilliinhape, sirelhape ja skopoletiin
- 4.6. Võrdluslahus: standardained lahustatakse 50-mahuprotsendilises vee-alkoholi lahuses. Lõplik kontsentratsioon võrdluslahuses peaks olema järgmine:

furfuraal: 5 mg/l; 5-hüdroksümetüülfurfuraal 10 mg/l; 5-metüülfurfuraal 2 mg/l; vanilliin; 5 mg/l; sirelaldehüüd: 10 mg/l; koniferüülaldehüüd: 5 mg/l; sinepaldehüüd: 5 mg/l; gallushape: 10 mg/l; ellaghape: 10 mg/l; vanilliinhape: 5 mg/l; sirelhape: 5 mg/l; skopoletiin: 0,5 mg/l.

5. Seadmed

Tavalised laboriseadmed.

- 5.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograaf, mille puhul saab kasutada kahekomponendilist gradienti ja mis on varustatud järgmisega:
 - 5.1.1. spektrofotomeetriline detektor, mis võimaldab mõõta lainepikkustel 260–340 nm. Piikide puhtuse kinnitamiseks soovitatakse siiski kasutada mitmel lainepikkusel töötavat detektorit koos dioodirea või samaväärse seadmega.
 - 5.1.2. Spektrofluoromeetriline detektor – ergastamise lainepikkus 354 nm, emissioonspektri lainepikkus 446 nm (skopoletiinjälgede kindlaksmääramiseks; neid saab tuvastada ka spektrofotomeetriliselt 313 nm juures).
 - 5.1.3. Sissesüstimiseseade, millega on võimalik sisestada 10 või 20 μ l (näiteks) uuritavat proovi.
 - 5.1.4. Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia kolonn, tüüp RP C18, osakeste maksimumsuurusega 5 μ m.
- 5.2. Süstlad HPLC jaoks.
- 5.3. Seade väikeste koguste membraanfiltramiseks.
- 5.4. Integreeriv arvutisüsteem või isekirjutaja, mis sobib ülejäänud seadmetega ja millel peab eelkõige olema mitu sisendkanalit.

6. Määramise käik

- 6.1. Süstitava lahuse valmistamine

Võrdluslahus ja piiritusjook filtritakse vajaduse korral läbi membraani, mille pooride läbimõõt on 0,45 μ m.

- 6.2. Kromatograafia tingimused: analüüs tehakse toatemperatuuril punktis 5.1 kirjeldatud seadmetega, kasutatakse liikuvaid faase (4.4) ja voolukiirust ligikaudu 0,6 ml minutis ning allpool esitatud gradienti (esitatud vaid näitena).

Aeg: 0 min, 50 min, 70 min, 90 min

Lahusti A (vesi/hape): 100 %, 60 %, 100 %, 100 %

Lahusti B: (metanool): 0 %, 40 %, 0 %, 0 %

Tuleb märkida, et teatavatel juhtudel tuleb osutatud gradienti muuta, et piigid ei elueeruks koos.

6.3. Määramine

- 6.3.1. Võrdlusstandardid süstitakse eraldi ja seejärel süstitakse seguna.

Töötingimusi kohandatakse selliselt, et iga ühendi piigi lahutusnäitaja on vähemalt 1.

- 6.3.2. Punkti 6.1 kohaselt ettevalmistatud proov süstitakse kolonni.

- 6.3.3. Mõõdetakse piikide pindalad võrdluslahuses ja piiritusjoogis ning arvutatakse kontsentratsioonid.

7. Tulemuste esitamine

Iga komponendi kontsentratsioon väljendatakse ühikutes mg/l.

8. Meetodi tulemuslikkuse näitajad (täpsus)

Järgmised andmed saadi 2009. aastal tehtud meetodi suutlikkuse rahvusvahelisest uuringust, mis tehti eri piiritusjookidega vastavalt rahvusvaheliselt heaks kiidetud korrale [1], [2].

8.1. Furfuraal

Analüüt	Furfuraal					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	15	15	15	15	15	15
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	14	12	13	14	13	13
Keskvärtus [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analüüt	Furfuraal					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	8	15	5	13	3	5
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

8.2. 5-hüdroksümetüülfurfuraal

Analüüt	5-hüdroksümetüülfurfuraal					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	16	16	16	16	16	16
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	14	14	14	14	14	14
Keskväärus [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	8	9	5	13	7	9
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

8.3. 5-metüülfurfuraal

Analüüt	5-metüülfurfuraal					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	11	11	11	11	11	11
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	11	11	8	11	10	11
Keskväärtus [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	35	18	22	39	12	35
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

8.4. Vanilliin

Analüüt	Vanilliin					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	16	15	16	16	16	16
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	16	15	16	16	16	16
Keskväärtus [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analüüt	Vanilliin					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	19	25	15	22	13	16
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

8.5. Sirelaldehyüd

Analüüt	Sirelaldehyüd					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	16	15	16	16	16	16
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	13	13	13	12	14	13
Keskvärtus [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	8	33	5	6	4	4
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

8.6. Koniferüülaldehüüd

Analüüt	Koniferüülaldehüüd					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	13	12	13	12	13	13
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	12	12	13	12	13	13
Keskväärtus [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	23	27	21	23	8	19
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

8.7. Sinepaldehüüd

Analüüt	Sinepaldehüüd					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	14	14	14	14	15	14
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	14	13	12	13	13	12
Keskväärtus [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analüüt	Sinepaldehüüd					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	31	27	46	13	10	73
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

8.8. Gallushape

Analüüt	Gallushape					
Proov	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	16	15	16	16	16	16
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	15	14	16	16	16	16
Keskväärtus [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	36	47	31	53	30	35
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

8.9. Ellaghape

Analüüt	Ellaghape					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	7	7	7	7	7	7
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	7	7	7	7	7	6
Keskväärtus [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	44	43	42	39	39	40
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	4,0	1,2	11	14	14	40

8.10. Vanilliinhape

Analüüt	Vanilliinhape					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	15	15	15	15	15	15
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	12	11	14	14	15	14
Keskväärtus [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analüüt	Vanilliinhape					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	28	20	35	31	51	26
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

8.11. Sirelhape

Analüüt	Sirelhape					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	16	15	16	16	16	16
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	16	15	15	15	16	15
Keskväärtus [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	19	29	11	18	13	14
Reprodutseeritavuse piirnorm R [g/l] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

8.12. Skopoletiin

Analüüt	Skopoletiin					
Proovid	Whisky	Brandy	Rumm	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Osalevate laborite arv	10	10	10	10	10	10
Kõlblikuks tunnistatud tulemuste arv (laborid)	9	8	9	8	8	8
Keskväärtus [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Korratavuse standardhälve s_r [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_r [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Korratavuse piirnorm r [mg/l] ($r = 2,8 \times s_r$)	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Reprodutseeritavuse suhteline standardhälve RSD_R [%]	15	16	23	17	15	15
Reprodutseeritavuse piirnorm 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.“