

## II

(Actes non législatifs)

## RÈGLEMENTS

## RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2016/635 DE LA COMMISSION

du 22 avril 2016

**modifiant l'annexe du règlement (CE) n° 2870/2000 en ce qui concerne certaines méthodes de référence pour l'analyse des boissons spiritueuses**

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (CE) n° 110/2008 du Parlement européen et du Conseil du 15 janvier 2008 concernant la définition, la désignation, la présentation, l'étiquetage et la protection des indications géographiques des boissons spiritueuses et abrogeant le règlement (CEE) n° 1576/89 du Conseil <sup>(1)</sup>, et notamment son article 28, paragraphe 2,

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement (CE) n° 2870/2000 de la Commission <sup>(2)</sup> énumère et décrit les méthodes d'analyse de référence applicables dans le secteur des boissons spiritueuses. Toutefois, certaines des méthodes mentionnées à l'annexe de ce règlement, parmi lesquelles les méthodes de détermination de l'acidité volatile et des sucres totaux dans les boissons alcoolisées, ne sont pas encore décrites.
- (2) Les méthodes de détermination de l'acidité volatile et des sucres totaux dans certaines boissons spiritueuses ont été soumises à deux études de validation internationales qui ont été menées conformément aux procédures agréées au niveau international, et leurs paramètres de performance ont été jugés acceptables. Les études ont été réalisées dans le cadre d'un projet de recherche faisant partie du programme Normes, mesures et essais du quatrième programme-cadre de la Commission européenne (CE). La description de ces méthodes devrait dès lors figurer à l'annexe du règlement (CE) n° 2870/2000.
- (3) Le règlement (CE) n° 110/2008 définit des exigences pour certaines catégories de boissons spiritueuses qui doivent vieillir dans des fûts en bois et prévoit que d'autres catégories peuvent faire l'objet de ce vieillissement. L'analyse des principaux composés extraits du bois peut être utile lorsqu'il s'agit de déterminer si l'échantillon est en conformité avec la définition correspondant à la catégorie concernée de boisson spiritueuse. Dans sa résolution OIV/OENO 382A/2009, l'Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV) a reconnu une méthode d'analyse permettant de déterminer la présence de ces composés. La reconnaissance de la méthode a été basée sur des données provenant d'une étude internationale sur la performance de la méthode sur différentes boissons spiritueuses, qui a été réalisée selon des procédures convenues au niveau international. Cette méthode et sa description devraient donc être ajoutées aux méthodes de référence de l'Union pour l'analyse des boissons spiritueuses mentionnées à l'annexe du règlement (CE) n° 2870/2000.
- (4) Il convient dès lors de modifier le règlement (CE) n° 2870/2000 en conséquence.
- (5) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité des boissons spiritueuses,

<sup>(1)</sup> JO L 39 du 13.2.2008, p. 16.

<sup>(2)</sup> Règlement (CE) n° 2870/2000 de la Commission du 19 décembre 2000 établissant des méthodes d'analyse communautaires de référence applicables dans le secteur des boissons spiritueuses (JO L 333 du 29.12.2000, p. 20).

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

*Article premier*

L'annexe du règlement (CE) n° 2870/2000 est modifiée conformément à l'annexe du présent règlement.

*Article 2*

Le présent règlement entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 22 avril 2016.

*Par la Commission*  
*Le président*  
Jean-Claude JUNCKER

---

## ANNEXE

L'annexe du règlement (CE) n° 2870/2000 est modifiée comme suit:

1) La table des matières est modifiée comme suit:

- a) aux points III.3 et VIII, les termes «(p.m.)» sont supprimés;
- b) le point suivant est ajouté:

«X. Dosage des composés du bois: furfural, 5-hydroxyméthylfurfural, 5-méthylfurfural, vanilline, syringaldéhyde, coniféraldéhyde, sinapaldéhyde, acide gallique, acide ellagique, acide vanillique, acide syringique et scopolétine.»

2) Au chapitre III, le point suivant est ajouté:

«III.3. DÉTERMINATION DES SUBSTANCES VOLATILES DANS LES BOISSONS SPIRITUEUSES

**1. Champ d'application**

La méthode a été validée dans le cadre d'une étude interlaboratoires pour le rhum, le brandy, le marc et les eaux-de-vie de fruits, dans des proportions allant de 30 mg/l à 641 mg/l.

**2. Références normatives**

ISO 3696:1987. Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécifications et méthodes d'essai.

**3. Définitions**

- 3.1. L'acidité volatile est calculée en déduisant l'acidité fixe de l'acidité totale.
- 3.2. L'acidité totale est la somme des acidités titrables.
- 3.3. L'acidité fixe est l'acidité du résidu après évaporation à sec de la boisson spiritueuse.

**4. Principe**

L'acidité totale et l'acidité fixe sont déterminées par titrage ou par potentiométrie.

**5. Réactifs et matériaux**

Au cours de l'analyse, sauf indication contraire, n'utiliser que des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau de classe 3 au minimum, répondant à la définition de la norme ISO 3696:1987.

5.1. Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,01 M.

5.2. Solution d'indicateur mixte:

Peser 0,1 g de carmin d'indigo et 0,1 g de rouge de phénol.

Dissoudre dans 40 ml d'eau et porter à 100 ml avec de l'éthanol.

**6. Appareil et équipement**

Appareil de laboratoire indirect, verrerie de catégorie A et ce qui suit.

6.1. Pompe à eau

- 6.2. Évaporateur rotatif ou bain à ultrasons
- 6.3. Équipement pour le titrage potentiométrique (facultatif)

## 7. Échantillonnage et échantillons

Les échantillons sont entreposés à température ambiante avant d'être analysés.

## 8. Procédure

### 8.1. Acidité totale

#### 8.1.1. Préparation de l'échantillon

La boisson spiritueuse est irradiée par ultrasons ou agitée pendant deux minutes sous vide pour la débarrasser du dioxyde de carbone, si nécessaire.

#### 8.1.2. Titrage

Introduire à l'aide d'une pipette 25 ml de la boisson spiritueuse dans une fiole Erlenmeyer de 500 ml.

Ajouter environ 200 ml d'eau distillée bouillie refroidie (préparée le jour même) et 2 à 6 gouttes de solution d'indicateur mixte (5.2).

Titre avec la solution d'hydroxyde de sodium 0,01 M (5.1) jusqu'à ce que la couleur jaune-vert vire au violet dans le cas des boissons spiritueuses incolores, ou que la couleur jaune-brun vire au rouge-brun dans le cas des boissons spiritueuses de couleur brune.

Le titrage peut également être réalisé par potentiométrie, jusqu'à un pH égal à 7,5.

Soit  $n_1$  ml le volume de solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium ajouté.

#### 8.1.3. Calcul

L'acidité totale (AT) exprimée en milliéquivalents par litre de boisson spiritueuse est égale à  $0,4 \times n_1$ .

L'acidité totale (AT') exprimée en mg d'acide acétique par litre de boisson spiritueuse est égale à  $24 \times n_1$ .

### 8.2. Acidité fixe

#### 8.2.1. Préparation de l'échantillon

Laisser évaporer à sec 25 ml de la boisson spiritueuse:

introduire à l'aide d'une pipette 25 ml de la boisson spiritueuse dans une capsule d'évaporation cylindrique à fond plat de 55 mm de diamètre. Pendant la première heure d'évaporation, la capsule est placée sur le couvercle d'un bain-marie bouillant de sorte que le liquide ne soit pas porté à ébullition, ce qui pourrait provoquer des pertes par projection.

Terminer la dessiccation en plaçant la capsule dans une étuve à 105 °C pendant deux heures. Laisser refroidir la capsule dans un dessiccateur.

#### 8.2.2. Titrage

Dissoudre le résidu obtenu après évaporation avec de l'eau distillée bouillie et refroidie (préparée le jour même), porter à un volume d'environ 100 ml et ajouter 2 à 6 gouttes de solution d'indicateur mixte (5.2).

Titre avec la solution d'hydroxyde de sodium 0,01 M (5.1).

Le titrage peut également être réalisé par potentiométrie, jusqu'à un pH de 7,5.

Soit  $n_2$  ml le volume de solution d'hydroxyde de sodium 0,01 M ajouté.

### 8.2.3. Calcul

L'acidité fixe (AF) exprimée en milliéquivalents par litre de boisson spiritueuse est égale à  $0,4 \times n_2$ .

L'acidité fixe (AF) exprimée en mg d'acide acétique par litre de boisson spiritueuse est égale à  $24 \times n_2$ .

## 9. Calcul de l'acidité volatile

### 9.1. Exprimée en milliéquivalents par litre:

Soit:

AT = l'acidité totale en milliéquivalents par litre

AF = l'acidité fixe en milliéquivalents par litre

L'acidité volatile (AV) en milliéquivalents par litre est égale à:

$$AT - AF$$

### 9.2. Exprimée en mg d'acide acétique par litre:

Soit:

AT' = acidité totale en mg d'acide acétique par litre

AF' = acidité fixe en mg d'acide acétique par litre

L'acidité volatile (AV) en mg d'acide acétique par litre est égale à:

$$AT' - AF'$$

### 9.3. Exprimée en acide acétique g/hl d'alcool à 100 % vol. pur est égale à: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

où A est le titre alcoométrique volumique de la boisson spiritueuse.

## 10. Caractéristiques de performance de la méthode (précision)

### 10.1. Résultats statistiques de l'essai interlaboratoires

Les données suivantes proviennent d'une étude internationale sur les performances de la méthode, réalisée conformément aux procédures établies au niveau international (1) (2).

<b>Année de l'essai interlaboratoires</b>	<b>2000</b>
Nombre de laboratoires	18
Nombre d'échantillons	6

Échantillons	A	B	C	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des cas extrêmes	16	18	18	14	18	18
Nombre de cas extrêmes (laboratoires)	2			4		
Nombre de résultats acceptés	32	36	36	28	36	36
Mean value ( $\bar{x}$ ) [mg/L]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Écart-type relatif de répétabilité, RSD <sub>r</sub> (%)	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l)	23	10	42	10	19	24
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Écart-type relatif de reproductibilité, RSD <sub>R</sub> (%)	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Limite de reproductibilité, $R$ (mg/l)	24	23	70	13	38	68

Types d'échantillons:

- A Eau-de-vie de prune; fraction \*
- B Rhum I; double aveugle
- C Rhum II; fraction \*
- D Slivovitz; double aveugle
- E Brandy; double aveugle
- F Eau-de-vie de marc; double aveugle

(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) Le chapitre VIII suivant est inséré:

#### «VIII. SUCRES TOTAUX

##### 1. Champ d'application

La méthode CLHP-IR permet de doser les sucres totaux (exprimés en sucres invertis) dans les boissons spiritueuses à l'exclusion des liqueurs contenant des œufs et des produits laitiers.

Elle a été validée dans le cadre d'une étude interlaboratoires pour le pastis, l'anis distillé, la liqueur de cerises, la crème de (suivie du nom d'un fruit ou de la matière première utilisée) et la crème de cassis, à des niveaux compris dans une fourchette allant de 10,86 g/l à 509,7 g/l. Toutefois, la linéarité de la réponse de l'instrument a été démontrée pour des concentrations comprises entre 2,5 g/l et 20,0 g/l.

Cette méthode n'est pas conçue pour doser de faibles niveaux de sucres.

## 2. **Références normatives**

ISO 3696:1987. Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécifications et méthodes d'essai.

## 3. **Principe**

Analyses par chromatographie liquide à haute performance de solutions de sucre afin de déterminer leur concentration en glucose, fructose, saccharose, maltose et lactose.

Cette méthode utilise une phase stationnaire d'alkylamine, et la détection à l'aide d'un réfractomètre différentiel est citée à titre d'exemple. L'utilisation de résines échangeuses d'anions pour la phase stationnaire serait également possible.

## 4. **Réactifs et matériaux**

- 4.1. Glucose (CAS 50-99-7), d'une pureté d'au moins 99 %.
- 4.2. Fructose (CAS 57-48-7), d'une pureté d'au moins 99 %.
- 4.3. Saccharose (CAS 57-50-1), d'une pureté d'au moins 99 %.
- 4.4. Lactose (CAS 5965-66-2), d'une pureté d'au moins 99 %.
- 4.5. Monohydrate de maltose (CAS 6363-53-7), d'une pureté d'au moins 99 %.
- 4.6. Acétonitrile pur (CAS 75-05-8) pour l'analyse CLHP.
- 4.7. Eau distillée ou déminéralisée, microfiltrée de préférence.
- 4.8. Solvants (exemple)

Le solvant d'élution est composé de:

75 unités en volume d'acétonitrile (4.6),

25 unités en volume d'eau distillée (4.7).

Dégazer par barbotage d'hélium à faible débit pendant 5 à 10 minutes avant utilisation.

Si l'eau utilisée n'a pas été microfiltrée, il est recommandé de filtrer le solvant avec un filtre pour solvants organiques d'un diamètre de pores inférieur ou égal à 0,45 µm.

- 4.9. Éthanol absolu (CAS 64-17-5).
- 4.10. Solution d'éthanol (5 %, v/v).
- 4.11. Préparation de la solution mère étalon (20 g/l)

Peser 2 g de chacun des sucres à analyser (4.1 à 4.5), les transférer sans perte dans une fiole jaugée de 100 ml. (NB 2,11 g de monohydrate de maltose correspondent à 2 g de maltose).

Ajuster à 100 ml avec une solution d'alcool à 5 % vol. (4.10), agiter et stocker à environ + 4 °C. Préparer une nouvelle solution mère une fois par semaine.

- 4.12. Préparation de solutions étalons de travail (2,5 g/l, 5,0 g/l, 7,5 g/l, 10,0 g/l et 20,0 g/l)

Diluer la solution mère, 20 g/l, (4.11) de manière adéquate avec une solution d'alcool de 5 % (4.10) pour obtenir cinq solutions standard de 2,5 g/l, 5,0 g/l, 7,5 g/l, 10,0 g/l et 20,0 g/l. Filtrer avec un filtre d'un diamètre de pores inférieur ou égal à 0,45 µm (5.3).

## 5. Appareil et équipement

5.1. Système CLHP capable de réaliser le retour à la ligne de base de l'ensemble des sucres.

5.1.1. Chromatographe liquide à haute performance avec une vanne d'injection à six voies munie d'une boucle de 10 µl ou de tout autre dispositif, automatique ou manuel, pour l'injection fiable de microvolumes.

5.1.2. Système de pompage permettant l'obtention et le maintien d'un débit constant ou programmé avec une grande précision.

5.1.3. Réfractomètre différentiel.

5.1.4. Intégrateur-calculateur ou enregistreur fonctionnant en toute compatibilité avec l'ensemble du système.

5.1.5. Précolonne:

il est recommandé de joindre une précolonne appropriée à la colonne d'analyse.

5.1.6. Colonne (exemple):

Matériau: acier inoxydable ou verre.

Diamètre interne: 2 à 5 mm.

Longueur: 100 à 250 mm (en fonction de la taille des particules d'emballage), par exemple 250 mm pour des particules de 5 µm de diamètre.

Phase stationnaire: groupes fonctionnels d'alkylamine lié à de la silice, granulométrie maximale 5 µm.

5.1.7. Conditions de la chromatographie (exemple):

Solvant d'élution (4.8), débit: 1 ml/minute.

Détection: réfractométrie différentielle.

Pour s'assurer que le détecteur est parfaitement stable, il convient de l'activer quelques heures avant l'emploi. La cellule de référence doit être remplie avec le solvant d'élution.

5.2. Balance d'analyse précise à 0,1 mg près.

5.3. Dispositif de filtration pour petits volumes utilisant une micromembrane de 0,45 µm.

## 6. Stockage de l'échantillon

Dès réception, les échantillons sont entreposés à température ambiante avant d'être analysés.

## 7. Procédure

7.1. PARTIE A: préparation de l'échantillon

7.1.1. Secouer l'échantillon.

7.1.2. Filtrer l'échantillon avec un filtre d'un diamètre de pores inférieur ou égal à 0,45 µm (5.3).

7.2. PARTIE B: CLHP

7.2.1. Détermination

Injecter 10 µl des solutions étalons (4.12) et les échantillons (7.1.2). Effectuer l'analyse dans les conditions appropriées de chromatographie, par exemple celles décrites ci-dessus.



- 7.2.2. Si un échantillon présente un pic d'une surface (ou d'une hauteur) supérieure au pic correspondant à la solution étalon la plus concentrée, il convient de diluer l'échantillon avec de l'eau distillée et de procéder à une nouvelle analyse.

## 8. Calcul

Comparer les deux chromatogrammes obtenus pour la solution étalon et la boisson spiritueuse. Recenser les pics en fonction de leur temps de rétention. Mesurer leur surface (ou leur hauteur) pour calculer les concentrations par la méthode de référence externe. Tenir compte de toutes les dilutions opérées lors de la préparation de l'échantillon.

Le résultat final est la somme de saccharose, de maltose, de lactose, de glucose et de fructose, exprimée en sucre inverti en g/l.

Le sucre inverti est égal à la somme de tous les monosaccharides, moins les disaccharides présents, plus la quantité stœchiométrique de glucose et de fructose calculée à partir du saccharose présent.

$$\begin{aligned} \text{Le sucre inverti (g/l)} &= \text{glucose (g/l)} + \text{fructose (g/l)} + \text{maltose (g/l)} + \text{lactose (g/l)} + \text{saccharose (g/l)} \times 1,05 \\ 1,05 &= (\text{poids moléculaire du fructose} + \text{poids moléculaire du glucose}) / \text{poids moléculaire du saccharose} \end{aligned}$$

## 9. Caractéristiques de performance de la méthode (précision)

### 9.1. Résultats statistiques de l'essai interlaboratoires

Les données suivantes proviennent d'une étude internationale sur les performances de la méthode, réalisée conformément aux procédures établies au niveau international (1) (2).

Année de l'essai interlaboratoires 2000

Nombre de laboratoires 24

Nombre d'échantillons 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".

Tableau 1

### Fructose, glucose, maltose

Analyte	Fructose		Glucose			Maltose	
	Crème de cassis	Norme (50 g/l)	Boisson spiritueuse à l'anis	Crème de cassis	Norme (50 g/l)	Boisson spiritueuse à l'anis	Norme (10 g/l)
Valeur moyenne (g/l)	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Nombre de laboratoires sans cas extrêmes	21	22	21	23	19	21	22
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (g/l)	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analyte	Fructose		Glucose			Maltose	
	Crème de cassis	Norme (50 g/l)	Boisson spiritueuse à l'anis	Crème de cassis	Norme (50 g/l)	Boisson spiritueuse à l'anis	Norme (10 g/l)
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Limite de répétabilité, $r$ (g/l) ( $r = 2,8 \times sr$ )	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Écart-type de reproductibilité, $s_r$ (g/l)	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times sR$ )	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Tableau 2

## Saccharose

Analyte	Saccharose					
	Pastis	Ouzo	Liqueur de cerises	Crème de menthe	Crème de cassis	Norme (100 g/l)
Valeur moyenne (g/l)	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Nombre de laboratoires sans cas extrêmes	19	19	20	18	18	18
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (g/l)	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Limite de répétabilité, $r$ (g/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (g/l)	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(\*) Fraction.

Tableau 3

**Sucres totaux**

(Remarque: Ces données ont été calculées pour les sucres totaux, et non pour le sucre inverti tel que défini au point 8).

Échantillons	Pastis	Ouzo	Boisson spiritueuse à l'anis	Liqueur de cerises	Crème de menthe	Crème de cassis	Norme (220 g/l)
Valeur moyenne (g/l)	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Nombre de laboratoires sans cas extrêmes	20	19	20	20	18	18	19
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (g/l)	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Limite de répétabilité, $r$ (g/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (g/l)	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(\*) Fraction.»

4) Le chapitre X suivant est ajouté:

«X. **DÉTERMINATION DES COMPOSÉS DE BOIS SUIVANTS DANS LES BOISSONS SPIRITUEUSES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP): FURFURAL, 5-HYDROXYMÉTHYL-FURFURAL, 5-MÉTHYLFURFURAL, VANILLINE, SYRINGALDÉHYDE, CONIFÉRALDÉHYDE, SINAPALDÉHYDE, ACIDE GALLIQUE, ACIDE ELLAGIQUE, ACIDE VANILLIQUE, ACIDE SYRINGIQUE ET SCOPOLÉTINE**

1. **Champ d'application**

La méthode a pour objet le dosage du furfural, du 5-hydroxyméthylfurfural, du 5-méthylfurfural, de la vanilline, de la syringaldéhyde, de la coniféraldéhyde, de la sinapaldéhyde, de l'acide gallique, de l'acide ellagique, de l'acide vanillique, de l'acide syringique et de la scopolétine par chromatographie en phase liquide à haute performance.

2. **Références normatives**

Méthode d'analyse reconnue par l'assemblée générale de l'Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV) et publiée par l'OIV sous la référence OIV-MA-BS- 16: R2009.

3. **Principe**

Dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), avec détection par spectrophotométrie UV à plusieurs longueurs d'ondes et par la spectrofluorimétrie.

#### 4. Réactifs

Les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau ayant une pureté au moins équivalente. Il est préférable d'utiliser de l'eau microfiltrée d'une résistivité de 18,2 M  $\Omega$ .cm.

- 4.1. Alcool à 96 % vol.
- 4.2. Méthanol de qualité CLHP (solvant B).
- 4.3. Acide acétique dilué à 0,5 % vol. (solvant A).
- 4.4. Phases mobiles (à titre d'exemple uniquement)

Solvant A (acide acétique à 0,5 %) et solvant B (méthanol pur). Filtrer à travers une membrane (porosité 0,45  $\mu$ m). Dégazer dans une cuve à ultrasons, si nécessaire.

- 4.5. Étalons de référence d'une pureté minimale de 99 %: furfural, 5-hydroxyméthylfurfural, 5-méthylfurfural, vanilline, syringaldéhyde, coniféraldéhyde, sinapaldéhyde, acide gallique, acide ellagique, acide vanillique, acide syringique et scopolétine
- 4.6. Solution de référence: les substances étalons sont dissoutes dans une solution hydroalcoolique à 50 % vol. Les concentrations finales dans la solution de référence devraient être de l'ordre de:

furfural: 5 mg/l; 5-hydroxyméthylfurfural: 10 mg/l; 5-méthylfurfural: 2 mg/l; vanilline: 5 mg/l; syringaldéhyde: 10 mg/l; coniféraldéhyde: 5 mg/l; sinapaldéhyde: 5 mg/l; acide gallique: 10 mg/l; acide ellagique: 10 mg/l; acide vanillique: 5 mg/l; acide syringique: 5 mg/l; scopolétine: 0,5 mg/l.

#### 5. Appareillage

Matériel courant de laboratoire

- 5.1. Un chromatographe en phase liquide à haute performance capable de fonctionner en mode gradient binaire et équipé des éléments suivants.
  - 5.1.1. Un détecteur spectrophotométrique capable de mesurer à des longueurs d'ondes comprises entre 260 et 340 nm. Toutefois, il est préférable de travailler avec un détecteur à longueurs d'ondes multiples à barrette de diodes par exemple pour pouvoir confirmer la pureté des pics.
  - 5.1.2. Un détecteur par spectrofluorimétrie — longueur d'onde d'excitation: 354 nm; longueur d'onde d'émission: 446 nm (pour le dosage fin de la scopolétine, qui est également détectable à 313 nm par spectrofluorimétrie).
  - 5.1.3. Un dispositif d'injection permettant d'introduire une prise d'essai de 10 ou 20  $\mu$ l, par exemple.
  - 5.1.4. Une colonne pour chromatographie liquide à haute performance, du type RP C18, d'une granulométrie maximale de 5  $\mu$ m.
- 5.2. Des seringues pour CLHP.
- 5.3. Un dispositif de filtration sur membrane de petits volumes.
- 5.4. Un calculateur-intégrateur ou enregistreur dont les performances sont compatibles avec l'ensemble de l'appareillage; il doit disposer, en particulier, de plusieurs canaux d'acquisition.

#### 6. Procédure

- 6.1. Préparation de la solution à injecter

La solution de référence et la boisson spiritueuse sont filtrées, le cas échéant, sur une membrane dont le diamètre des pores est de 0,45  $\mu$ m au maximum.

- 6.2. Conditions opératoires chromatographiques: effectuer l'analyse à température ambiante avec l'équipement décrit au point 5.1 et en utilisant les phases mobiles (4.4) à un débit d'environ 0,6 ml par minute selon le gradient ci-dessous (donné à titre d'exemple uniquement)

Temps: 0 min 50 min 70 min 90 min

Solvant A (eau-acide): 100 % 60 % 100 % 100 %

Solvant B (méthanol): 0 % 40 % 0 % 0 %

Notez que, dans certains cas, il y a lieu de modifier ce gradient pour éviter des coélutions.

- 6.3. Détermination

- 6.3.1. Injecter les étalons de référence séparément, puis mélangés.

Adapter les conditions opératoires de sorte que les facteurs de résolution des pics de tous les composés soient au moins égaux à 1.

- 6.3.2. Injecter l'échantillon tel qu'élaboré au point 6.1.

- 6.3.3. Mesurer la surface des pics dans la solution de référence et dans la boisson spiritueuse et calculer les concentrations.

## 7. Expression des résultats

Exprimer la concentration de chaque constituant en mg/l.

## 8. Caractéristiques de performance de la méthode (précision)

Les données suivantes ont été obtenues en 2009 à partir d'une étude internationale relative à la performance de la méthode sur différentes boissons spiritueuses, réalisée selon les procédures convenues au niveau international (1) (2).

- 8.1. Furfural

Analyte	Furfural					
	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Échantillons						
Nombre de laboratoires participants	15	15	15	15	15	15
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	14	12	13	14	13	13
Valeur moyenne (mg/l)	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5

Analyte	Furfural					
	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Échantillons						
Limite de répétabilité, r (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	8	15	5	13	3	5
Limite de reproductibilité, R (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

## 8.2. 5-Hydroxyméthylfurfural

Analyte	5-Hydroxyméthylfurfural					
	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Échantillons						
Nombre de laboratoires participants	16	16	16	16	16	16
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	14	14	14	14	14	14
Valeur moyenne (mg/l)	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Limite de répétabilité, r (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	8	9	5	13	7	9
Limite de reproductibilité, R (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

## 8.3. 5-Méthylfurfural

Analyte	5-Méthylfurfural					
Échantillons	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	11	11	11	11	11	11
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	11	11	8	11	10	11
Valeur moyenne (mg/l)	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	35	18	22	39	12	35
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

## 8.4. Vanilline

Analyte	Vanilline					
Échantillons	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	16	15	16	16	16	16
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	16	15	16	16	16	16
Valeur moyenne (mg/l)	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09

Analyte	Vanilline					
	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	19	25	15	22	13	16
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

## 8.5. Syringaldéhyde

Analyte	Syringaldéhyde					
	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	16	15	16	16	16	16
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	13	13	13	12	14	13
Valeur moyenne (mg/l)	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	8	33	5	6	4	4
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2



## 8.6. Coniféraldéhyde

Analyte	Coniféraldéhyde					
Échantillons	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	13	12	13	12	13	13
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	12	12	13	12	13	13
Valeur moyenne (mg/l)	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	23	27	21	23	8	19
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

## 8.7. Sinapaldéhyde

Analyte	Sinapaldéhyde					
Échantillons	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	14	14	14	14	15	14
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	14	13	12	13	13	12
Valeur moyenne (mg/l)	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analyte	Sinapaldéhyde					
	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	31	27	46	13	10	73
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

## 8.8. Acide gallique

Analyte	Acide gallique					
	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	16	15	16	16	16	16
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	15	14	16	16	16	16
Valeur moyenne (mg/l)	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	36	47	31	53	30	35
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

## 8.9. Acide ellagique

Analyte	Acide ellagique					
Échantillons	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	7	7	7	7	7	7
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	7	7	7	7	7	6
Valeur moyenne (mg/l)	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	44	43	42	39	39	40
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	4,0	1,2	11	14	14	40

## 8.10. Acide vanillique

Analyte	Acide vanillique					
Échantillons	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	15	15	15	15	15	15
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	12	11	14	14	15	14
Valeur moyenne (mg/l)	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21

Analyte	Acide vanillique					
Échantillons	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	28	20	35	31	51	26
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

## 8.11. Acide syringique

Analyte	Acide syringique					
Échantillons	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Nombre de laboratoires participants	16	15	16	16	16	16
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	16	15	15	15	16	15
Valeur moyenne (mg/l)	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	19	29	11	18	13	14
Limite de reproductibilité, $R$ (g/l) ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

## 8.12. Scopolétine

Analyte	Scopolétine					
	Whisky	Brandy	Rhum	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Échantillons						
Nombre de laboratoires participants	10	10	10	10	10	10
Nombre de résultats acceptés (laboratoires)	9	8	9	8	8	8
Valeur moyenne (mg/l)	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Écart-type de répétabilité, $s_r$ (mg/l)	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Écart-type relatif de répétabilité, $RSD_r$ (%)	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Limite de répétabilité, $r$ (mg/l) ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Écart-type de reproductibilité, $s_R$ (mg/l)	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Écart-type relatif de reproductibilité, $RSD_R$ (%)	15	16	23	17	15	15
Limite de reproductibilité, $R$ (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".»