Ce document constitue un outil de documentation et n'engage pas la responsabilité des institutions

►**B** **RÈGLEMENT (CE) Nº 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)

Modifié par:

		Journal officiel		
		nº	page	date
►**M1**	Règlement (CE) nº 2091/2002 de la Commission du 26 novembre 2002	L 322	11	27.11.2002

▼B

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

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CEE) n° 1576/89 du Conseil du 29 mai 1989 établissant les règles générales relatives à la définition, à la désignation et à la présentation des boissons spiritueuses ([1]), modifié par l'acte d'adhésion de l'Autriche, de la Finlande et de la Suède, et notamment son article 4, paragraphe 8,

considérant ce qui suit:

(1) L'article 4, paragraphe 8, du règlement (CEE) n° 1576/89 prévoit l'adoption des méthodes à utiliser pour l'analyse des boissons spiritueuses. Lors de tout contrôle officiel et en cas de litige, il convient d'appliquer des méthodes de référence afin d'assurer le respect des dispositions du règlement (CEE) n° 1576/89 et du règlement (CEE) n° 1014/90 de la Commission du 24 avril 1990 portant modalités d'application pour la définition, la désignation et la présentation des boissons spiritueuses ([2]), modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 2140/98 ([3]).

(2) Il serait opportun, dans la mesure du possible, de retenir et de décrire comme méthodes d'analyse communautaires de référence, les méthodes généralement reconnues.

(3) Afin de tenir compte des progrès scientifiques et des différences d'équipement des laboratoires officiels, il convient de permettre, sous la responsabilité du chef de laboratoire concerné, l'application de méthodes d'analyse fondées sur d'autres principes de mesure que les méthodes de référence décrites à l'annexe du présent règlement, lorsque ces méthodes offrent des garanties suffisantes quant aux résultats et répondent en particulier aux critères établis à l'annexe de la directive 85/591/CEE du Conseil du 20 décembre 1985 concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle des denrées destinées à l'alimentation humaine ([4]) et pour autant qu'il puisse être démontré que l'exactitude, la répétabilité et la reproductibilité des résultats obtenus se situent dans les limites des résultats obtenus par les méthodes de référence décrites dans le présent règlement. Lorsque cette condition est respectée, il y a lieu de permettre l'application d'autres méthodes d'analyse. Il importe cependant de préciser que, en cas de litige, ces méthodes ne peuvent remplacer les méthodes de référence.

(4) Les mesures prévues par le présent règlement sont conformes à l'avis du comité d'application des boissons spiritueuses,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Les méthodes d'analyse communautaires de référence applicables dans le secteur des boissons spiritueuses, afin d'assurer le respect des dispositions du règlement (CEE) n° 1576/89 et du règlement (CEE) n° 1014/90:

— lors de tout contrôle officiel ou

([1]) JO L 160 du 12.6.1989, p. 1.
([2]) JO L 105 du 25.4.1990, p. 9.
([3]) JO L 270 du 7.10.1998, p. 9.
([4]) JO L 372 du 31.12.1985, p. 50.

▼B

— lors de tout litige,

sont celles énoncées à l'annexe du présent règlement.

Article 2

Par dérogation à l'article 1er, premier tiret, l'application d'autres méthodes d'analyse est admise, sous la responsabilité du directeur de laboratoire, à condition que l'exactitude et la précision (répétabilité et reproductibilité) de ces méthodes soient au moins équivalentes à celles des méthodes d'analyse de référence correspondantes, figurant à l'annexe.

Article 3

Lorsque des méthodes d'analyse communautaires de référence ne sont pas prévues pour la détection et la quantification des substances contenues dans une boisson spiritueuse donnée, les méthodes d'analyse suivantes sont applicables:

a) méthodes d'analyse validées conformément à des procédures internationalement reconnues et répondant en particulier aux critères établis à l'annexe de la directive 85/591/CEE;

b) méthodes d'analyse conformes aux normes recommandées par l'Organisation internationale de normalisation (ISO);

c) méthodes d'analyse reconnues et publiées par l'assemblée générale de l'Office international de la vigne et du vin (OIV);

d) lorsque les méthodes visées aux points a), b) et c) ne peuvent pas être appliquées et au vu de son exactitude, de sa répétabilité et de sa reproductibilité:

   — toute méthode d'analyse agréée par l'État membre concerné,

   — le cas échéant, toute autre méthode d'analyse appropriée.

Article 4

Aux fins du présent règlement, on entend par:

a) «limite de répétabilité»: la valeur au-dessous de laquelle ou à laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essais obtenus sous des conditions de répétabilité (même opérateur, même appareil, même laboratoire et court intervalle de temps) {ISO 3534-1};

b) «limite de reproductibilité»: la valeur au-dessous de laquelle ou à laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essais obtenus sous des conditions de reproductibilité (opérateurs, appareils et laboratoires différents) {ISO 3534-1};

c) «exactitude»: l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée {ISO 3534-1}.

Article 5

Le présent règlement entre en vigueur le septième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Il est applicable à partir du 1er janvier 2001.

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

▼**B**

ANNEXE

DESCRIPTION DES MÉTHODES D'ANALYSE DE RÉFÉRENCE

I. Détermination du titre alcoométrique volumique

Appendice I — Préparation du distillat

Appendice II — Mesure de la masse volumique du distillat

— Méthode A = pycnométrie

— Méthode B = densimétrie électronique

— Méthode C = densimétrie sur balance hydrostatique

II. Détermination de l'extrait sec total par gravimétrie

III. Détermination des substances volatiles et du méthanol

III.1. Remarques générales

III.2. Substances volatiles cogénérées: aldéhydes, alcools supérieurs, acétate d'éthyle et méthanol (chromatographie en phase gazeuse)

III.3. Acidité volatile (p.m.)

IV. Acide cyanhydrique (p.m.)

V. Anéthole ►**M1** ——— ◄

VI. Acide glycyrrhizique ►**M1** ——— ◄

VII. Chalcones ►**M1** ——— ◄

VIII. Sucres totaux (p.m.)

IX. Jaune d'œuf ►**M1** ——— ◄

▼B

I. DÉTERMINATION DU TITRE ALCOOMÉTRIQUE VOLUMIQUE DES BOISSONS SPIRITUEUSES

Introduction

La méthode de référence fait l'objet de deux appendices.

Appendice I — Préparation du distillat

Appendice II — Mesure de la masse volumique du distillat

1. **Champ d'application**

La méthode convient pour la détermination du titre alcoométrique volumique réel des boissons spiritueuses.

2. **Références normatives**

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

3. **Termes et définitions**

3.1. *Température de référence*

La température de référence pour la détermination du titre alcoométrique volumique, de la masse volumique et de la densité relative des boissons spiritueuses est de 20 ºC.

Remarque 1: On réservera l'expression «à t ºC» aux déterminations (de la masse volumique ou du titre alcoométrique volumique) exprimées à une température autre que la température de référence de 20 ºC.

3.2. *Masse volumique*

La masse volumique est le quotient de la masse d'un certain volume de boisson spiritueuse à 20 ºC par ce volume dans le vide. Elle s'exprime en kilogrammes par mètre cube et son symbole est $\rho_{20\ ^\circ C}$ ou ρ_{20}.

3.3. *Densité relative*

La densité relative est le rapport, exprimé en nombre décimal, de la masse volumique des boissons spiritueuses à 20 ºC à la masse volumique de l'eau à la même température. Elle est désignée par le symbole $d_{20\ ^\circ C/20\ ^\circ C}$ ou $d_{20/20}$, ou simplement d lorsqu'aucune confusion n'est possible. La caractéristique mesurée doit être précisée dans le certificat d'analyse exclusivement à l'aide des symboles définis ci-dessus.

Remarque 2: Il est possible d'obtenir la densité relative à partir de la masse volumique ρ_{20} à 20 ºC:

$\rho_{20} = 998{,}203 \times d_{20/20}$ ou $d_{20/20} = \rho_{20}/998{,}203$, où 998,203 est la masse volumique de l'eau à 20 ºC.

3.4. *Titre alcoométrique volumique réel*

Le titre alcoométrique volumique réel des boissons spiritueuses est égal au nombre de litres d'alcool éthylique contenu dans 100 litres de mélange hydroalcoolique ayant la même masse volumique que la boisson spiritueuse après distillation. Les valeurs de référence à utiliser pour le titre alcoométrique volumique (% vol.) à 20 ºC en fonction de la masse volumique à 20 ºC des mélanges hydroalcooliques sont celles qui figurent dans la table internationale adoptée par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa recommandation nº 22.

L'équation générale reliant le titre alcoométrique volumique et la masse volumique des mélanges hydroalcooliques à une température donnée est indiquée au chapitre 3 «Titre alcoométrique volumique», page 40, de l'annexe du règlement (CEE) nº 2676/90 (JO L 272 du 3.10.1990, p. 1) et dans le recueil des méthodes d'analyse de l'OIV (1994) (p. 17).

Remarque 3: Dans le cas des liqueurs et des crèmes, pour lesquelles il est très difficile de mesurer un volume exact, l'échan-

▼B

tillon doit être pesé et l'on calcule d'abord le titre alcoométrique massique.

Formule de conversion:

$$\text{titre alcoométrique volumique (\% vol.)} = \frac{\text{TAM (\% masse)} \times P_{20}\text{ (échantillon)}}{P_{20}\text{ (alcool)}}$$

où TAM = titre alcoométrique massique,

ρ_{20} (alcool) = 789,24 kg/m^3

4. **Principe**

Après distillation, le titre alcoométrique volumique du distillat est déterminé par pycnométrie, par densimétrie électronique ou par densimétrie sur balance hydrostatique.

▼B

APPENDICE I: PRÉPARATION DU DISTILLAT

1. **Champ d'application**

La méthode convient pour la préparation des distillats utilisés pour déterminer le titre alcoométrique volumique réel des boissons spiritueuses.

2. **Principe**

Les boissons spiritueuses sont distillées pour séparer les «matières extractives» (substances ne distillant pas) de l'alcool éthylique et autres composés volatils.

3. **Réactifs et matériaux**

3.1. Billes antiprojection.

3.2. Agent antimousse sous forme concentrée (pour les crèmes).

4. **Appareillage et matériel**

Appareillage courant de laboratoire, et notamment:

4.1. Bain-marie pouvant être maintenu entre 10 et 15 ºC.

Bain-marie pouvant être maintenu à 20 ºC (± 0,2 ºC).

4.2. Fioles jaugées (100 et 200 ml) de classe A, vérifiées à ± 0,1 et 0,15 % respectivement.

4.3. Appareil de distillation

4.3.1. Prescriptions générales

L'appareil de distillation à utiliser doit respecter les caractéristiques suivantes:

— un nombre de connexions limité au strict nécessaire assurant l'étanchéité du système,

— un dispositif destiné à empêcher le primage (entraînement du liquide à ébullition par la vapeur) et à régulariser le débit de distillation des vapeurs de richesse alcoolique élevée,

— la condensation rapide et totale des vapeurs alcooliques,

— la réception des premières fractions du distillat en milieu aqueux.

La source de chaleur doit mettre en œuvre un dispositif approprié de diffusion de la chaleur afin d'éviter toute pyrogénation des matières extractives.

4.3.2. La figure 1 montre, à titre d'exemple, un appareil de distillation approprié, qui comprend:

— un ballon d'un litre de capacité, équipé d'un rodage normalisé,

— une colonne rectificatrice d'une hauteur minimale de 20 cm (colonne de Vigreux par exemple),

— un tube de connexion coudé pourvu, dans sa partie droite, d'un réfrigérant à bords droits (dit «de West») d'une longueur de 10 cm environ,

— un réfrigérant à serpentin de 40 cm de long,

— un tube effilé permettant de conduire le distillat au fond d'une fiole jaugée réceptrice contenant un faible volume d'eau.

Remarque: L'appareil décrit ci-dessus est prévu pour un échantillon d'au moins 200 ml. Il est toutefois possible de distiller un échantillon de taille plus petite en ayant recours à un ballon plus petit, à condition d'utiliser une boule à distiller ou tout autre dispositif permettant d'éviter l'entraînement du liquide.

5. **Conservation des échantillons pour essai**

Les échantillons sont stockés à température ambiante avant l'analyse.

6. **Mode opératoire**

Remarque préalable

La distillation peut également être effectuée conformément au mode opératoire publié par l'IUPAC (1968).

6.1. Contrôle de l'appareil de distillation

▼B

L'appareil utilisé doit répondre aux exigences suivantes:

La distillation d'une solution hydroalcoolique de 200 ml dont la concentration est connue et voisine de 50 % vol. ne doit pas produire de perte d'alcool supérieure à 0,1 % vol.

6.2. Boissons spiritueuses dont le titre alcoométrique est inférieur à 50 % vol.

Prélever à l'aide d'une fiole jaugée 200 ml de boisson spiritueuse.

Noter la température du liquide ou maintenir la température normale (20 ºC).

Verser l'échantillon dans le ballon de l'appareil de distillation et rincer la fiole jaugée avec trois volumes d'eau distillée d'environ 20 ml chacun. Ajouter chaque volume d'eau de rinçage au contenu du ballon de distillation.

Remarque: Cette dilution de 60 ml est suffisante dans le cas des boissons spiritueuses contenant moins de 250 g d'extrait sec par litre. Sinon, pour éviter les pyrolyses, il faut que le volume des liquides de rinçage soit au moins de 70 ml si l'extrait sec est de 300 g/l, 85 ml pour un extrait sec de 400 g/l et 100 ml pour un extrait sec de 500 g/l (certaines liqueurs ou crèmes de fruits). Ajuster ces volumes proportionnellement en fonction des différents échantillons.

Ajouter quelques billes antiprojection (3.1) (et de l'agent antimousse pour les crèmes).

Verser 20 ml d'eau distillée dans la fiole jaugée d'origine de 200 ml, qui sera utilisée pour recueillir le distillat. Cette fiole doit ensuite être placée dans un bain d'eau froide (4.1) (10 à 15 ºC pour les boissons spiritueuses anisées).

Distiller (éviter tout phénomène d'entraînement ou de carbonisation) en agitant de temps en temps le contenu de la fiole jusqu'à ce que le distillat atteigne un niveau situé à quelques millimètres au-dessous du trait de repère de la fiole jaugée.

Une fois la température du distillat ramenée au niveau initial à plus ou moins 0,5 ºC près, porter jusqu'au trait de repère à l'aide d'eau distillée et bien mélanger.

Le distillat est utilisé pour déterminer le titre alcoométrique volumique (appendice II).

6.3. Boissons spiritueuses dont le titre alcoométrique est supérieur à 50 % vol.

Prélever 100 ml de boisson spiritueuse à l'aide d'une fiole jaugée de 100 ml et verser le liquide dans le ballon de l'appareil de distillation.

Rincer la fiole jaugée à plusieurs reprises avec de l'eau distillée et ajouter les liquides de rinçage au contenu du ballon à distiller. Utiliser suffisamment d'eau pour que le contenu de ce ballon atteigne environ 230 ml.

Verser 20 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 200 ml, qui sera utilisée pour recueillir le distillat. Cette fiole doit ensuite être placée dans un bain d'eau froide (4.1) (10 à 15 ºC pour les boissons spiritueuses anisées).

Distiller en agitant de temps en temps jusqu'à ce que le distillat atteigne un niveau situé à quelques millimètres au-dessous du trait de repère de la fiole jaugée de 200 ml.

Une fois la température du distillat ramenée au niveau initial à plus ou moins 0,5 ºC près, porter jusqu'au trait de repère à l'aide d'eau distillée et bien mélanger.

Le distillat est utilisé pour déterminer le titre alcoométrique volumique (appendice II).

Remarque: Le titre alcoométrique volumique de la boisson spiritueuse est deux fois supérieur à celui du distillat.

▼B

APPENDICE II: MESURE DE LA MASSE VOLUMIQUE DU DISTILLAT

MÉTHODE A: DÉTERMINATION DU TITRE ALCOOMÉTRIQUE VOLUMIQUE RÉEL DES BOISSONS SPIRITUEUSES PAR PYCNOMÉTRIE

A.1. **Principe**

Le titre alcoométrique volumique est obtenu à partir de la masse volumique du distillat mesurée par pycnométrie.

A.2. **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.

A.2.1. Solution de chlorure de sodium (2 % p/v)

Pour préparer 1 litre, peser 20 g de chlorure de sodium et dissoudre au volume avec de l'eau.

A.3. **Appareillage et matériel**

Appareillage courant de laboratoire, et notamment:

A.3.1. Balance analytique d'une sensibilité de 0,1 mg.

A.3.2. Thermomètre à rodage émeri gradué par dixième de degré de 10 à 30 ºC. Ce thermomètre doit être certifié ou vérifié avec un thermomètre certifié.

A.3.3. Pycnomètre en verre Pyrex de 100 ml de capacité environ, pourvu d'un thermomètre mobile à rodage émeri (A.3.2). Il comporte un tube latéral de 25 mm de long et de 1 mm au plus de diamètre intérieur, terminé par une partie conique rodée. D'autres pycnomètres décrits dans la norme ISO 3507, de 50 ml par exemple, peuvent être utilisés le cas échéant.

A.3.4. Flacon tare de même volume extérieur (à moins de 1 ml près) que le pycnomètre et de masse égale à celle du pycnomètre plein d'un liquide d'une densité de 1,01 (solution de chlorure de sodium A.2.1).

A.3.5. Enceinte calorifugée s'adaptant exactement au corps du pycnomètre.

Remarque 1: La méthode de détermination de la masse volumique dans le vide des boissons spiritueuses requiert l'utilisation d'une balance à deux plateaux, d'un pycnomètre et d'un flacon tare de même volume extérieur pour annuler l'effet de la poussée de l'air à tout moment donné. Cette technique simple peut être appliquée au moyen d'une balance monoplateau, moyennant la pesée supplémentaire du flacon tare pour suivre les variations de la poussée de l'air dans le temps.

A.4. **Mode opératoire**

Remarques préalables

Le mode opératoire suivant est décrit pour l'utilisation d'un pycnomètre de 100 ml en vue de déterminer le titre alcoométrique, ce qui donne la meilleure précision. Il est toutefois possible d'utiliser un pycnomètre de volume inférieur, 50 ml par exemple.

A.4.1. Étalonnage du pycnomètre

L'étalonnage du pycnomètre comporte la détermination des caractéristiques suivantes:

— tare à vide,

— volume à 20 ºC,

— masse en eau à 20 ºC.

A.4.1.1. Étalonnage à l'aide d'une balance monoplateau

Déterminer:

— la masse du pycnomètre propre et sec (P),

— la masse du pycnomètre plein d'eau à t ºC (P1),

— la masse du flacon tare (T0).

A.4.1.1.1. Peser le pycnomètre propre et sec (P).

▼B

A.4.1.1.2. Remplir avec soin le pycnomètre d'eau distillée à température ambiante et mettre en place le thermomètre.

Essuyer soigneusement le pycnomètre et le placer dans l'enceinte calorifugée. Agiter par retournement jusqu'à ce que la température lue sur le thermomètre soit constante.

Affleurer exactement au bord supérieur du tube latéral. Lire soigneusement la température t ºC et la corriger le cas échéant de l'inexactitude de l'échelle du thermomètre.

Peser le pycnomètre plein d'eau (P1).

A.4.1.1.3. Peser le flacon tare (T0).

A.4.1.1.4. Calcul

— Tare du pycnomètre vide = P – m

où m est la masse de l'air contenu dans le pycnomètre.

m = 0,0012 × (P1 – P)

Remarque 2: 0,0012 est la masse volumique de l'air sec à 20 ºC sous une pression de 760 mm de Hg.

— Volume du pycnomètre à 20 ºC

$V_{20\,°C} = [P1 - (P - m)] \times F_t$

où F_t est le facteur relevé pour la température t ºC dans la table I du chapitre 1 «Masse volumique et densité relative» de l'annexe du règlement (CEE) nº 2676/90 (p. 10).

$V_{20\,°C}$ doit être connu à 0,001 ml près.

— Masse de l'eau contenue dans le pycnomètre à 20 ºC

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ où 0,998203 est la masse volumique de l'eau à 20 ºC.

Remarque 3: Si nécessaire, la valeur de la masse volumique dans l'air (0,99715) peut être utilisée et le titre alcoométrique calculé en référence à la densité dans l'air correspondante dans les tables du service des douanes et accises du Royaume-Uni.

A.4.1.2. Étalonnage à l'aide d'une balance à deux plateaux

A.4.1.2.1. Placer le flacon tare sur le plateau gauche de la balance et le pycnomètre propre et sec, muni de son bouchon récepteur, sur le plateau droit. Réaliser l'équilibre en plaçant à côté du pycnomètre des masses marquées, soit p grammes.

A.4.1.2.2. Remplir avec soin le pycnomètre d'eau distillée à température ambiante et mettre en place le thermomètre; essuyer soigneusement le pycnomètre et le placer dans l'enceinte calorifugée; agiter par retournement jusqu'à ce que la température lue sur le thermomètre soit constante.

Affleurer exactement au bord supérieur du tube latéral. Nettoyer le tube latéral, placer le bouchon récepteur; lire la température t ºC avec soin et, le cas échéant, corriger le résultat de l'inexactitude de l'échelle du thermomètre.

Peser le pycnomètre plein d'eau, soit p′ la masse en grammes qui réalise l'équilibre.

A.4.1.2.3. Calcul

— Tare du pycnomètre vide = p + m

où m est la masse de l'air contenu dans le pycnomètre.

m = 0,0012 × (p – p′)

— Volume du pycnomètre à 20 ºC

$V_{20\,°C} = (p + m - p') \times F_t$

où F_t est le facteur relevé pour la température t º dans la table I du chapitre 1 «Masse volumique et densité relative» de l'annexe du règlement (CEE) nº 2676/90 (p. 10).

$V_{20\,°C}$ doit être connu à 0,001 ml près.

— Masse de l'eau contenue dans le pycnomètre à 20 ºC

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$

où 0,998203 est la masse volumique de l'eau à 20 ºC.

▼B

A.4.2. Détermination du titre alcoométrique de l'échantillon pour essai

A.4.2.1. Utilisation d'une balance monoplateau

A.4.2.1.1. Peser le flacon tare, soit T1 sa masse.

A.4.2.1.2. Peser le pycnomètre plein du distillat préparé (voir appendice I), soit P2 sa masse à t ºC.

A.4.2.1.3. Calcul

— dT = T1 - T0

— Masse du pycnomètre vide au moment de la mesure

= P − m + dT

— Masse du liquide contenu dans le pycnomètre à t ºC

= P2 − (P − m + dT)

— Masse volumique à t ºC en g/ml

— $P_{t\,°C} = [P_2 - (P - m + dT)]/V_{20\,°C}$

— Exprimer la masse volumique à t ºC en kilogrammes par m³ en multipliant $_{\rho t\,°C}$ par 1000, soit ρ_t cette valeur.

— Corriger ρ_t à l'aide de la table des masses volumiques ρT des mélanges hydroalcooliques [table II de l'annexe II du recueil des méthodes d'analyse de l'OIV (1994), p. 17 à 29].

Dans cette table, chercher sur la ligne horizontale correspondant à la température entière T immédiatement inférieure à t ºC la plus petite masse volumique supérieure à ρ_t. Utiliser la différence tabulaire lue sous cette masse volumique pour calculer la masse volumique ρ_t de la boisson spiritueuse à cette température entière T.

— En utilisant la ligne de température entière, calculer la différence entre la masse volumique p′ de la table immédiatement supérieure à ρ_t et la masse volumique calculée ρ_t. Diviser cette différence par la différence tabulaire lue à droite de la masse volumique ρ′. Le quotient donne la partie décimale du titre alcoométrique, tandis que la partie entière de ce titre est indiquée au sommet de la colonne dans laquelle figure la masse volumique ρ′ (soit Dt ce titre alcoométrique).

Remarque 4: il est également possible de conserver le pycnomètre dans un bain-marie d'eau à 20 ºC (± 0,2 ºC) pour porter jusqu'au trait de repère.

A.4.2.1.4. Résultat

À l'aide de la masse volumique ρ_{20}, calculer le titre alcoométrique volumique réel en utilisant les tables mentionnées ci-dessous.

La table indiquant la valeur du titre alcoométrique volumique (% vol.) à 20 ºC en fonction de la masse volumique à 20 ºC des mélanges hydroalcooliques est la table internationale adoptée par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa recommandation nº 22.

A.4.2.2. Utilisation d'une balance à deux plateaux

A.4.2.2.1. Peser le pycnomètre plein du distillat préparé (voir appendice I), soit p″ sa masse à t ºC.

A.4.2.2.2. Calcul

— Masse du liquide contenu dans le pycnomètre à t ºC

= p + m − p″

— Masse volumique à t ºC en g/ml

$P_{t\,°C} = (p + m - p'')/V_{20\,°C}$

— Exprimer la masse volumique à t ºC en kilogrammes par m³ et procéder à la correction de température afin de calculer le titre alcoométrique à 20 ºC, en suivant les indications fournies pour l'utilisation de la balance monoplateau.

▼B

A.5. **Caractéristiques de performance de la méthode (précision)**

A.5.1. Résultats statistiques de l'essai interlaboratoire

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 interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 20

Nombre d'échantillons: 6

Échantillons	A	B	C	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	19	20	17	19	19	17
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	1	—	2	1	1	3
Nombre de résultats acceptés	38	40	34	38	38	34
Valeur moyenne ($\bar{x}$) % vol.	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) % vol.	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Limite de répétabilité (r) % vol.	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Écart-type de reproductibilité (S_R) % vol.	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Limite de reproductibilité (R) % vol.	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Types d'échantillons:
A Liqueur de fruit; doubles avec une teneur différente (*).
B Brandy; doubles en aveugle.
C Whisky; doubles en aveugle.
D Grappa; doubles avec une teneur différente (*).
E Aquavit; doubles avec une teneur différente (*).
F Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

MÉTHODE B: DÉTERMINATION DU TITRE ALCOOMÉTRIQUE VOLUMIQUE RÉEL DES BOISSONS SPIRITUEUSES PAR DENSIMÉTRIE ÉLECTRONIQUE (PRINCIPE DE LA MESURE DE LA FRÉQUENCE D'OSCILLATION DE LA CELLULE D'UN RÉSONATEUR DE FLEXION)

B.1. **Principe**

La masse volumique du liquide est déterminée par la mesure électronique des oscillations d'un tube en U vibrant. Pour réaliser cette mesure, l'échantillon est introduit dans un système oscillant dont la fréquence d'oscillation propre est ainsi modifiée par la masse ajoutée.

B.2. **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.

B.2.1. Acétone (CAS 666-52-4) ou alcool absolu.

B.2.2. Air sec.

▼B

B.3. **Appareillage et matériel**

Appareillage courant de laboratoire, et notamment:

B.3.1. Densimètre à affichage numérique

Les densimètres électroniques à utiliser pour réaliser ces mesures doivent pouvoir afficher la masse volumique en g/ml avec cinq décimales.

Remarque 1: Le densimètre doit être placé sur un support parfaitement stable et isolé de toutes vibrations.

B.3.2. Régulation de la température

Les performances du densimètre ne sont respectées qu'à la condition de raccorder la cellule de mesure à un dispositif intégré de régulation thermique permettant d'obtenir la même stabilité (± 0,02 ºC) ou une meilleure stabilité de température.

Remarque 2: L'ajustement précis et le contrôle de la température de la cellule de mesure sont des paramètres très importants, car une erreur de 0,1 ºC peut entraîner une variation de masse volumique de l'ordre de 0,1 kg/m^3.

B.3.3. Seringues d'injection d'échantillons ou échantillonneur automatique.

B.4. **Mode opératoire**

B.4.1. Étalonnage du densimètre

L'appareil doit être étalonné conformément aux instructions du fabricant lors de la mise en service initiale. Il devra être réétalonné régulièrement et contrôlé à l'appui d'un étalon de référence certifié ou d'une solution de référence interne au laoratoire raccordée à un étalon de référence certifié.

B.4.2. Détermination de la masse volumique de l'échantillon

B.4.2.1. Avant de procéder à la mesure, si nécessaire, nettoyer et sécher la cellule à l'acétone ou à l'alcool absolu et à l'air sec. Rincer la cellule avec l'échantillon.

B.4.2.2. Injecter l'échantillon dans la cellule (à l'aide d'une seringue ou d'un échantillonneur automatique) de sorte que celle-ci soit remplie entièrement. Lors du remplissage, veiller à l'élimination complète des bulles d'air. L'échantillon doit être homogène et ne contenir aucune particule solide. Le cas échéant, éliminer toute matière en suspension par filtration avant l'analyse.

B.4.2.3. Une fois la lecture stabilisée, enregistrer la masse volumique ρ_{20} ou le titre alcoométrique affiché par le densimètre.

B.4.3. Résultat

Lorsque la masse volumique ρ_{20} est utilisée, calculer le titre alcoométrique volumique réel en utilisant les tables mentionnées ci-dessous.

La table indiquant la valeur du titre alcoométrique volumique (% vol.) à 20 ºC en fonction de la masse volumique à 20 ºC des mélanges hydroalcooliques est la table internationale adoptée par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa recommandation nº 22.

B.5. **Caractéristiques de performance de la méthode (précision)**

B.5.1. Résultats statistiques de l'essai interlaboratoire

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 interlaboratoire:	1997
Nombre de laboratoires:	16
Nombre d'échantillons:	6

▼B

Échantillons	A	B	C	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	11	13	15	16	14	13
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	2	3	1	—	1	2
Nombre de résultats acceptés	22	26	30	32	28	26
Valeur moyenne ($\bar{x}$) % vol.	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) % vol.	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Limite de répétabilité (r) % vol.	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Écart-type de reproductibilité (S_R) % vol.	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Limite de reproductibilité (R) % vol.	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Types d'échantillons:
A Liqueur de fruit; doubles avec une teneur différente (*).
B Brandy; doubles en aveugle.
C Whisky; doubles en aveugle.
D Grappa; doubles avec une teneur différente (*).
E Aquavit; doubles avec une teneur différente (*).
F Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

MÉTHODE C: DÉTERMINATION DU TITRE ALCOOMÉTRIQUE VOLUMIQUE RÉEL DES BOISSONS SPIRITUEUSES PAR DENSIMÉTRIE SUR BALANCE HYDROSTATIQUE

C.1. **Principe**

Le titre alcoométrique des boissons spiritueuses peut être mesuré par densimétrie sur balance hydrostatique suivant le principe d'Archimède selon lequel tout corps plongé dans un fluide subit une poussée verticale, dirigée de bas en haut, égale au poids du fluide déplacé.

C.2. **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.

C.2.1. Solution de lavage du flotteur (hydroxyde de sodium, 30 % p/v)

Pour préparer une solution de 100 ml, peser 30 g d'hydroxyde de sodium et porter au volume à l'aide d'éthanol à 96 % en volume.

C.3. **Appareillage et matériel**

Appareillage courant de laboratoire, et notamment:

C.3.1. Balance hydrostatique monoplateau d'une sensibilité de 1 mg.

C.3.2. Flotteur d'un volume d'au moins 20 ml, spécialement adapté à la balance, suspendu par un fil d'un diamètre inférieur ou égal à 0,1 mm.

C.3.3. Éprouvette cylindrique comportant un repère de niveau. Le flotteur doit pouvoir occuper entièrement le volume de l'éprouvette situé au-dessous du repère; la surface du liquide ne peut être traversée que par le fil de suspension. L'éprouvette cylindrique doit avoir un diamètre intérieur supérieur d'au moins 6 mm à celui du flotteur.

C.3.4. Thermomètre (ou sonde de mesure de la température) gradué en degrés et dixièmes de degré, de 10 à 40 ºC, étalonné à 0,05 ºC près.

▼B

C.3.5. Poids étalonnés par un organisme de certification reconnu.

Remarque 1: L'utilisation d'une balance à deux plateaux est également possible; le principe en est décrit au chapitre 1 «Masse volumique et densité relative» de l'annexe du règlement (CEE) nº 2676/90 (p. 7).

C.4. **Mode opératoire**

Entre chaque mesure, le flotteur et l'éprouvette doivent être nettoyés à l'eau distillée, essuyés avec un papier de laboratoire doux ne perdant pas ses fibres et rincés avec la solution dont la masse volumique est à déterminer. Les mesures doivent être effectuées dès que l'appareil a atteint sa stabilité afin de limiter les pertes d'alcool par évaporation.

C.4.1. Étalonnage de la balance

Bien que les balances soient généralement pourvues d'un système d'étalonnage interne, la balance hydrostatique doit pouvoir être étalonnée avec des poids contrôlés par un organisme de certification officiel.

C.4.2. Étalonnage du flotteur

C.4.2.1. Remplir l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère avec de l'eau bidistillée (ou d'une pureté équivalente, par exemple de l'eau microfiltrée d'une conductivité de 18,2 MΩ/cm), dont la température sera comprise entre 15 et 25 ºC, mais se situera de préférence à 20 ºC.

C.4.2.2. Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter, lire la masse volumique du liquide sur l'appareil et, si nécessaire, corriger cette lecture pour qu'elle soit égale à celle de l'eau à la température de la mesure.

C.4.3. Contrôle à l'aide d'une solution hydroalcoolique

C.4.3.1. Remplir l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère avec un mélange hydroalcoolique de titre connu, dont la température sera comprise entre 15 et 25 ºC, mais se situera de préférence à 20 ºC.

C.4.3.2. Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter, lire la masse volumique du liquide sur l'appareil (ou le titre alcoométrique si ce dernier le permet). Le titre alcoométrique ainsi établi doit être égal au titre alcoométrique précédemment déterminé.

Remarque 2: Cette solution de titre alcoométrique connu peut également remplacer l'eau bidistillée pour l'étalonnage du flotteur.

C.4.4. Mesure de la masse volumique d'un distillat (ou de son titre alcoométrique si l'appareillage le permet)

C.4.4.1. Verser l'échantillon pour essai dans l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère de niveau.

C.4.4.2. Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter, lire la masse volumique du liquide sur l'appareil (ou le titre alcoométrique si ce dernier le permet). Noter la température si la masse volumique est mesurée à t ºC (ρ_t).

C.4.4.3. Corriger ρ_t à l'aide de la table des masses volumiques ρT des mélanges hydroalcooliques [table II de l'annexe II du recueil des méthodes d'analyse de l'OIV (1994), p. 17 à 29].

C.4.5. Nettoyage du flotteur et de l'éprouvette cylindrique

C.4.5.1. Plonger le flotteur dans la solution de lavage versée dans l'éprouvette.

C.4.5.2. Laisser tremper une heure en tournant le flotteur régulièrement.

C.4.5.3. Rincer abondamment à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée.

C.4.5.4. Essuyer avec un papier de laboratoire doux ne perdant pas ses fibres.

Réaliser ces opérations lors de la première utilisation du flotteur, puis régulièrement dès que nécessaire.

C.4.6. Résultat

À l'aide de la masse volumique ρ_{20}, calculer le titre alcoométrique volumique réel en utilisant les tables mentionnées ci-dessous.

La table indiquant la valeur du titre alcoométrique volumique (% vol.) à 20 ºC en fonction de la masse volumique à 20 ºC des mélanges hydroalcooliques est la table internationale adoptée par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa recommandation nº 22.

▼B

C.5. **Caractéristiques de performance de la méthode (précision)**

C.5.1. Résultats statistiques de l'essai interlaboratoire

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 interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 12

Nombre d'échantillons: 6

Échantillons	A	B	C	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	12	10	11	12	11	9
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	—	2	1	—	1	2
Nombre de résultfats acceptés	24	20	22	24	22	18
Valeur moyenne ($\bar{x}$) % vol.	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) % vol.	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Limite de répétabilité (r) % vol.	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Écart-type de reproductibilité (S_R) % vol.	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Limite de reproductibilité (R) % vol.	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Types d'échantillons:
A Liqueur de fruit; doubles avec une teneur différente (*).
B Brandy; doubles en aveugle.
C Whisky; doubles en aveugle.
D Grappa; doubles avec une teneur différente (*).
E Aquavit; doubles avec une teneur différente (*).
F Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

▼B

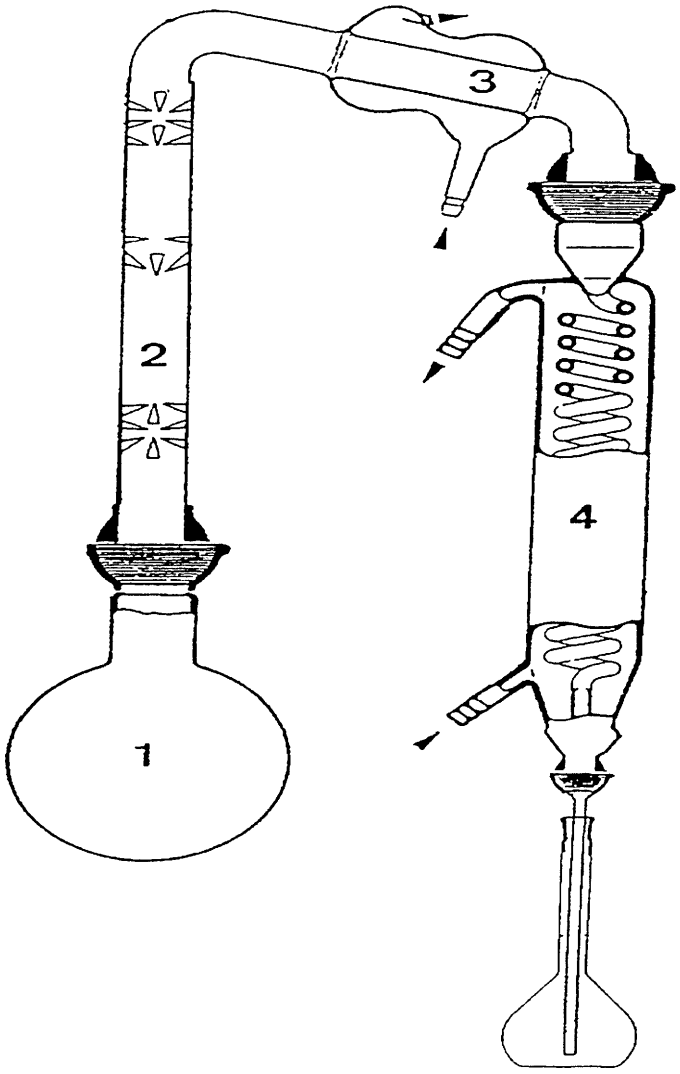


Figure 1. Appareil de distillation servant à la mesure du titre alcoométrique volumique réel des boissons spiritueuses

1. Ballon de 1 litre de capacité, à rodage sphérique normalisé.
2. Colonne rectificatrice de Vigreux de 20 cm.
3. Réfrigérant de West à bords droits de 10 cm.
4. Réfrigérant à serpentin de 40 cm.

▼B

II. DÉTERMINATION DE L'EXTRAIT SEC TOTAL DES BOISSONS SPIRITUEUSES PAR GRAVIMÉTRIE

1. Champ d'application

Le règlement (CEE) nº 1576/89 ne prévoit l'application de cette méthode que pour l'aquavit dont l'extrait sec est limité à 15 g/l.

2. Références normatives

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

3. Définition

L'extrait sec total ou «matières sèches totales» est l'ensemble de toutes les substances qui, dans des conditions physiques déterminées, ne se volatilisent pas.

4. Principe

Pesée du résidu laissé par l'évaporation de la boisson spiritueuse sur un bain-marie bouillant et traitement dans une étuve à dessiccation.

5. Appareillage et matériel

5.1. Capsule cylindrique à fond plat de 55 mm de diamètre.

5.2. Bain-marie bouillant.

5.3. Pipette de 25 ml de classe A.

5.4. Étuve à dessiccation.

5.5. Dessiccateur.

5.6. Balance analytique d'une sensibilité de 0,1 mg.

6. Échantillonnage et échantillons

Les échantillons sont stockés à température ambiante avant l'analyse.

7. Mode opératoire

7.1. Introduire à la pipette 25 ml de boisson spiritueuse contenant moins de 15 g/l de matières sèches dans une capsule cylindrique à fond plat de 55 mm de diamètre, préalablement tarée. 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. Laisser encore une heure directement en contact avec la vapeur du bain-marie bouillant.

7.2. Terminer la dessiccation en plaçant la capsule dans une étuve à 105 ºC ± 3 ºC pendant deux heures. Laisser refroidir la capsule dans un dessiccateur et peser la capsule et son contenu.

8. Calcul

La masse du résidu multipliée par 40 est égale à l'extrait sec contenu dans la boisson spiritueuse, qui doit être exprimé en g/l avec une décimale.

9. Caractéristiques de performance de la méthode (précision)

9.1. Résultats statistiques de l'essai interlaboratoire

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 interlaboratoire:	1997
Nombre de laboratoires:	10
Nombre d'échantillons:	4

▼B

Échantillons	A	B	C	D
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	9	9	8	9
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	1	1	2	—
Nombre de résultats acceptés	18	18	16	18
Valeur moyenne ($\bar{x}$) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Écart-type de répétabilité (S_r) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Limite de répétabilité (r) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Écart-type de reproductibilité (S_R) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Limite de reproductibilité (R) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Rhum; doubles avec une teneur différente.
C Grappa; doubles avec une teneur différente.
D Aquavit; doubles avec une teneur différente.

▼B

III. DÉTERMINATION DES SUBSTANCES VOLATILES ET DU MÉTHANOL DANS LES BOISSONS SPIRITUEUSES

III.1. REMARQUES GÉNÉRALES

1. **Définitions**

Le règlement (CEE) nº 1576/89 fixe, pour un certain nombre de boissons spiritueuses (rhum, eaux-de-vie d'origine viticole, eaux-de-vie de fruits, etc.), des teneurs minimales en composés volatils autres que les alcools éthylique et méthylique. Conventionnellement, pour cette série de boissons exclusivement, ces teneurs sont considérées comme équivalentes à la somme des teneurs en:

1) acides volatils exprimés en acide acétique;

2) aldéhydes exprimés en éthanal par la somme de l'éthanal (acétaldéhyde) et de la fraction éthanal contenue dans 1,1-diéthoxyéthane (acétal);

3) alcools supérieurs suivants: propan-1-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-méthylpropan-1-ol, exprimés en chacun des alcools dosés individuellement, 2-méthylbutan-1-ol et 3-méthylbutan-1-ol, exprimés en chacun des alcools dosés individuellement ou par la somme des deux alcools;

4) acétate d'éthyle.

Les méthodes conventionnelles permettant de doser les composés volatils sont les suivantes:

— la mesure de l'acidité volatile pour les acides volatils,

— la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour les aldéhydes (éthanal et acétal), l'acétate d'éthyle et les alcools.

2. **Détermination des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse**

La détermination par chromatographie en phase gazeuse des composés volatils autres que ceux indiqués ci-dessus peut se révéler un moyen particulièrement intéressant pour identifier l'origine de la matière première ayant servi à la distillation et les conditions mêmes de la distillation.

Certaines boissons spiritueuses contiennent d'autres substances volatiles, notamment des composés aromatiques, qui sont caractéristiques de la nature des matières premières utilisées pour l'obtention de l'alcool, de l'arôme de la boisson spiritueuse et des particularités de sa préparation. Ces composés sont importants pour l'évaluation des exigences fixées par le règlement (CEE) nº 1576/89.

III.2. DÉTERMINATION DES SUBSTANCES VOLATILES COGÉNÉRÉES: ALDÉHYDES, ALCOOLS SUPÉRIEURS, ACÉTATE D'ÉTHYLE ET MÉTHANOL PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

1. **Champ d'application**

Cette méthode convient pour la détermination des composés suivants: 1,1-diéthoxyéthane (acétal), 2-méthylbutan-1-ol (alcool amylique), 3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique), méthanol (alcool méthylique), éthanoate d'éthyle (acétate d'éthyle), butan-1-ol (n-butanol), butan-2-ol (sec-butanol), 2-méthylpropan-1-ol (alcool isobutylique), propan-1-ol (n-propanol) et éthanal (acétaldéhyde). Elle fait appel à un étalon interne, par exemple le pentan-3-ol. Les concentrations des analytes sont exprimées en grammes par hectolitre d'alcool absolu; le titre alcoométrique du produit doit être déterminé avant l'analyse. Les boissons spiritueuses que permet d'analyser cette méthode sont notamment le whisky, le brandy, le rhum, l'eau-de-vie de vin, l'eau-de-vie de fruit et l'eau-de-vie de marc de raisin.

2. **Références normatives**

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

3. **Définition**

Les substances cogénérées sont des substances volatiles qui se forment en même temps que l'éthanol lors de la fermentation, de la distillation et de la maturation des boissons spiritueuses.

▼B

4. **Principe**

Les substances cogénérées sont déterminées par injection directe de la boisson spiritueuse, ou de la boisson spiritueuse convenablement diluée, dans un système de chromatographie en phase gazeuse (CPG). Un étalon interne approprié est ajouté à la boisson spiritueuse avant l'injection. Les substances cogénérées sont séparées par programmation de la température d'une colonne adaptée et sont détectées à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La concentration de chacune d'entre elles est déterminée par rapport à l'étalon interne au vu des facteurs de réponse, qui sont obtenus lors de l'étalonnage dans les conditions chromatographiques identiques à celles de l'analyse de la boisson spiritueuse.

5. **Réactifs et matériaux**

Sauf indication contraire, n'utiliser que des réactifs d'une pureté supérieure à 97 %, achetés auprès d'un fournisseur agréé par l'ISO et munis d'un certificat de pureté, exempts d'autres substances cogénérées lors de la dilution d'essai (la confirmation peut être apportée par l'injection d'un étalon de chaque substance cogénérée lors de la dilution d'essai dans les conditions CPG indiquées au point 6.4) et de l'eau de classe 3 au minimum, répondant à la définition de la norme ISO 3696. L'acétal et l'acétaldéhyde doivent être stockés dans l'obscurité à une température inférieure à 5 °C. Tous les autres réactifs peuvent être stockés à température ambiante.

5.1. Éthanol absolu (CAS 64-17-5).

5.2. Méthanol (CAS 67-56-1).

5.3. Propan-1-ol (CAS 71-23-8).

5.4. 2-méthylpropan-1-ol (CAS 78-33-1).

5.5. Étalons internes acceptables: pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-méthylpentan-1-ol (CAS 626-89-1) ou nonanoate de méthyle (CAS 1731-84-6).

5.6. 2-méthylbutan-1-ol (CAS 137-32-6).

5.7. 3-méthylbutan-1-ol (CAS 123-51-3).

5.8. Acétate d'éthyle (CAS 141-78-6).

5.9. Butan-1-ol (CAS 71-36-3).

5.10. Butan-2-ol (CAS 78-92-2).

5.11. Acétaldéhyde (CAS 75-07-0).

5.12. Acétal (CAS 105-57-7).

5.13. Solution d'éthanol à 40 % v/v.

Pour préparer une solution d'éthanol à 400 ml/l, verser 400 ml d'éthanol (5.1), dans une fiole jaugée de 1 l, porter au volume avec de l'eau distillée et bien mélanger.

5.14. Préparation et conservation des solutions titrées (procédure utilisée pour la méthode validée)

Toutes les solutions titrées doivent être stockées à une température inférieure à 5 °C et être renouvelées tous les mois. La masse des constituants et des solutions doit être donnée à 0,1 mg près.

5.14.1. Solution titrée — A

Introduire à la pipette les réactifs suivants dans une fiole jaugée de 100 ml, contenant environ 60 ml de solution d'éthanol (5.13) pour minimiser l'évaporation des constituants, porter au volume à l'aide de la solution d'éthanol (5.13) et bien mélanger. Noter le poids de la fiole et de chaque constituant ajouté, ainsi que le poids total final du contenu.

Constituant	Volume (ml)
Méthanol (5.2)	3,0
Propan-1-ol (5.3)	3,0
2-méthylpropan-1-ol (5.4)	3,0
2-méthylbutan-1-ol (5.6)	3,0
3-méthylbutan-1-ol (5.7)	3,0
Acétate d'éthyle (5.8)	3,0

▼B

Constituant	Volume (ml)
Butan-1-ol (5.9)	3,0
Butan-2-ol (5.10)	3,0
Acétaldéhyde (5.11)	3,0
Acétal (5.12)	3,0

Remarque 1: Il est préférable d'ajouter l'acétal et l'acétaldéhyde en dernier lieu afin de minimiser les pertes par évaporation.

5.14.2. Solution titrée — B

Introduire à la pipette 3 ml de pentan-3-ol ou d'un autre étalon interne approprié (5.5) dans une fiole jaugée de 100 ml, contenant environ 80 ml de solution d'éthanol (5.13), porter au volume à l'aide de la solution d'éthanol (5.13) et bien mélanger.

Noter le poids de la fiole et du pentan-3-ol ou de tout autre étalon interne ajouté, ainsi que le poids total final du contenu.

5.14.3. Solution titrée — C

Introduire à la pipette 1 ml de solution A (5.14.1) et 1 ml de solution B (5.14.2) dans une fiole jaugée de 100 ml, contenant environ 80 ml de solution d'éthanol (5.13), porter au volume à l'aide de la solution d'éthanol (5.13) et bien mélanger.

Noter le poids de la fiole et de chaque constituant ajouté ainsi que le poids total final du contenu.

5.14.4. Solution titrée — D

Afin de maintenir la continuité analytique, préparer un étalon de contrôle de la qualité à l'aide de l'étalon A précédemment préparé (5.14.1). Introduire à la pipette 1 ml de solution A (5.14.1) dans une fiole jaugée de 100 ml, contenant environ 80 ml de solution d'éthanol (5.13), porter au volume à l'aide de la solution d'éthanol (5.13) et bien mélanger.

Noter le poids de la fiole et de chaque constituant ajouté ainsi que le poids total final du contenu.

5.14.5. Solution titrée — E

Introduire à la pipette 10 ml de solution B (5.14.2) dans une fiole jaugée de 100 ml, contenant environ 80 ml de solution d'éthanol (5.13), porter au volume à l'aide de la solution d'éthanol (5.13) et bien mélanger.

Noter le poids de la fiole et de chaque constituant ajouté ainsi que le poids total final du contenu.

5.14.6. Solutions titrées servant à contrôler la linéarité de la réponse du FID

Dans différentes fioles jaugées de 100 ml, contenant environ 80 ml d'éthanol (5.13), introduire à la pipette 0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 ml de solution A (5.14.1) et 1 ml de solution B (5.14.2), porter au volume à l'aide de la solution d'éthanol (5.13) et bien mélanger.

Noter le poids de la fiole et de chaque constituant ajouté ainsi que le poids total final du contenu.

5.14.7. Solution titrée de contrôle de la qualité (CQ)

Introduire à la pipette 9 ml de solution titrée D (5.14.4) et 1 ml de solution titrée E (5.14.5) dans un récipient et bien mélanger.

Noter le poids de la fiole et de chaque constituant ajouté ainsi que le poids total final du contenu.

6. **Appareillage et matériel**

6.1. Appareillage permettant de mesurer la masse volumique et le titre alcoométrique.

6.2. Balance analytique capable d'afficher le résultat avec quatre décimales.

6.3. Chromatographe en phase gazeuse à température programmable, doté d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un intégrateur ou de tout autre système de gestion de données capable de mesurer les aires ou les hauteurs de pic.

▼B

6.4. Colonne(s) de chromatographie en phase gazeuse permettant de séparer les analytes de sorte que la résolution minimum entre les différents constituants (autres que le 2-méthylbutan-1-ol et le 3-méthylbutan-1-ol) soit au moins de 1,3.

Remarque 2: Les colonnes et conditions CPG mentionnées ci-après sont des exemples qui conviennent pour la détermination souhaitée.

1) Colonne de garde de 1 m × 0,32 mm de diamètre intérieur, connecté à une colonne CP-WAX 57 CB de 50 m × 0,32 mm de diamètre intérieur, avec une épaisseur de film (polyéthylène-glycol stabilisé) de 0,2 µm, puis une colonne Carbowax 400 de 50 m × 0,32 mm de diamètre intérieur, avec une épaisseur de film de 0,2 µm (les colonnes sont assemblées par des connecteurs sans volume mort).

Gaz vecteur et pression:	hélium (135 kPa)
Température de la colonne:	35 ºC pendant 17 min, 35 à 70 ºC à 12 ºC/min, maintenir à 70 ºC pendant 25 min
Température de l'injecteur:	150 ºC
Température du détecteur:	250 ºC
Volume d'injection:	1 µl, *split* 20 à 100:1

2) Colonne de garde de 1 m × 0,32 mm de diamètre intérieur, connecté à une colonne CP-WAX 57 CB de 50 m × 0,32 mm de diamètre intérieur, avec une épaisseur de film (polyéthylène-glycol stabilisé) de 0,2 µm, (la colonne de garde est assemblée à l'aide d'un connecteur sans volume mort).

Gaz vecteur et pression:	hélium (65 kPa)
Température de la colonne:	35 ºC pendant 10 min, 35 à 110 ºC à 5 ºC/min, 110: à 190 ºC à 30 ºC/min, maintenir à 190 ºC pendant 2 min
Température de l'injecteur:	260 ºC
Température du détecteur:	300 ºC
Volume d'injection:	1 µl, *split* 55:1

3) Colonne remplie (5% CW 20 M, Carbopak B) 2 m × 2 mm de diamètre intérieur.

Température de la colonne:	65 ºC pendant 4 min, 65 à 140 ºC à 10 ºC/min, maintenir à 140 ºC pendant 5 min, 140 à 150 ºC à 5 ºC/min, maintenir à 150 ºC pendant 3 min
Température de l'injecteur:	65 ºC
Température du détecteur:	200 ºC
Volume d'injection:	1 µl

7. **Échantillonnage et échantillons**

7.1. Échantillon de laboratoire

Le titre alcoométrique de chaque échantillon est mesuré dès réception (6.1).

▼B

8. **Mode opératoire (procédure utilisée pour la méthode validée)**

8.1. Prise d'essai

8.1.1. Peser un récipient fermé adapté pour la pesée et noter son poids.

8.1.2. Introduire à la pipette 9 ml d'échantillon de laboratoire dans le récipient et noter le poids ($M_{échantillon}$).

8.1.3. Ajouter 1 ml de solution titrée E (5.14.5) et noter le poids (M_{IS}).

8.1.4. Secouer l'échantillon vigoureusement (au moins vingt retournements). Les échantillons doivent être stockés à une température inférieure à 5 ºC avant l'analyse afin de minimiser les pertes par évaporation.

8.2. Essai à blanc

8.2.1. À l'aide d'une balance à quatre décimales (6.2), peser un récipient fermé adapté pour la pesée et noter son poids.

8.2.2. Introduire à la pipette 9 ml de solution d'éthanol à 400 ml/l (5.13) dans le récipient et noter le poids.

8.2.3. Ajouter 1 ml de solution titrée E (5.14.5) et noter le poids.

8.2.4. Secouer le matériau d'essai vigoureusement (au moins vingt retournements). Les échantillons doivent être stockés à une température inférieure à 5 ºC avant l'analyse afin de minimiser les pertes par évaporation.

8.3. Essai préliminaire

Injecter la solution titrée C (5.14.3) pour que tous les analytes soient séparés avec une résolution minimale de 1,3 (sauf le 2-méthylbutan-1-ol et le 3-méthylbutan-1-ol.

8.4. Étalonnage

Il convient de contrôler l'étalonnage conformément à la procédure suivante. Veiller à ce que la réponse soit linéaire en analysant successivement en triple chacune des solutions titrées servant à contrôler la linéarité (5.14.6), contenant un étalon interne (IS). À partir des aires ou hauteurs de pic de l'intégrateur pour chaque injection, calculer le rapport R pour chaque substance cogénérée et représenter R graphiquement en fonction du taux de concentration de ces substances par rapport à l'étalon interne (IS), C. Un tracé linéaire doit être obtenu, avec un/coefficient de corrélation d'au moins 0,99.

$$R = \frac{\text{Aire ou hauteur de pic de la substance}}{\text{Aire ou hauteur de pic de l'IS}}$$

$$C = \frac{\text{Concentration de la substance (µg/g)}}{\text{Concentration de l'IS (µg/g)}}$$

8.5. Détermination

Injecter la solution titrée C (5.14.3) et deux solutions titrées CQ (5.14.7). Procéder ensuite avec des échantillons inconnus (préparés conformément aux instructions des points 8.1 et 8.2) en insérant un étalon de contrôle de la qualité tous les dix échantillons afin d'assurer la stabilité analytique. Injecter une solution titrée C (5.14.3) tous les cinq échantillons.

9. **Calcul**

Il est possible d'utiliser un système automatisé de gestion des données, pour autant que celles-ci puissent être contrôlées conformément aux principes décrits ci-dessous.

Mesurer soit les aires soit les hauteurs de pic des substances cogénérées et de l'étalon interne.

9.1. Calcul du facteur de réponse

À partir du chromatogramme de l'injection de la solution titrée C (5.14.3), calculer les facteurs de réponse de chaque substance cogénérée au moyen de l'équation (1).

$$(1)\ \text{Facteur de réponse} = \frac{\text{Aire ou hauteur de pic de l'IS}}{\text{Aire ou hauteur de pic de la substance}} \times \frac{\text{Concentration substance (µg/g)}}{\text{Concentration IS (µg/g)}}$$

▼B

où:

IS = étalon interne

Conc. substance = concentration de la substance dans la solution C (5.14.3)

Conc. IS = concentration de l'étalon interne dans la solution C (5.14.3)

9.1.2. Analyse de l'échantillon

À l'aide de l'équation (2) figurant ci-dessous, calculer la concentration de chaque substance dans les échantillons.

(2) Concentrations des substances (µg/g) =

$$\frac{\text{Aire ou hauteur de pic de la substance}}{\text{Aire ou hauteur de pic}} \times \frac{M_{IS}\ (g)}{M_{ÉCH}\ (g)} \times \text{Conc. IS (µg/g)} \times \text{RF}$$

où:

$M_{ÉCH}$ = poids de l'échantillon (8.1.2)

M_{IS} = poids de l'étalon interne (8.1.3)

Conc. IS = concentration de l'étalon interne dans la solution E (5.14.5)

RF = facteur de réponse calculé à l'aide de l'équation 1

9.1.3. Analyse de la solution titrée de contrôle de la qualité

À l'aide de l'équation (3) figurant ci-dessous, calculer le taux de récupération de la valeur cible pour les différents substances contenues dans les étalons CQ (5.14.7).

$$\text{(3) \% récup. échantillon CQ} = \frac{\text{concentration de l'analyse dans l'étalon CQ}}{\text{concentration de l'analyte dans la solution D}} \times 100$$

La concentration de l'analyte dans l'étalon CQ est calculée en utilisant les équations (1) et (2).

9.2. Présentation finale des résultats

Pour les échantillons, les résultats sont convertis de µg/g en g par hectolitre d'alcool absolu à l'aide de l'équation (4).

(4) Concentration en g par hectolitre d'alcool absolu =

$$\text{Conc (µg/g)} \times \rho \times 10/[\text{titre (\% vol.)} \times 1\ 000]$$

où

ρ = masse volumique en kg/m^3.

Les résultats sont exprimés avec trois chiffres significatifs et une décimale au maximum, par exemple, 11,4 g par hectolitre d'alcool absolu.

10. **Assurance et contrôle de la qualité (utilisés pour la méthode validée)**

À l'aide de l'équation (2), calculer la concentration de chaque substance cogénérée dans les solutions titrées de contrôle de la qualité préparées conformément au mode opératoire décrit aux points 8.1.1 à 8.1.4. Utiliser l'équation (3) pour calculer le taux de récupération de la valeur cible. Si les résultats analysés sont compris entre ± 10 % de leurs valeurs théoriques pour chaque substance, l'analyse peut être réalisée. Dans le cas contraire, il convient de rechercher la cause de l'inexactitude et de prendre les mesures correctives qui s'imposent.

11. **Caractéristiques de performance de la méthode (précision)**

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoire: Les tableaux suivants regroupent les valeurs pour les composés suivants: éthanal, acétate d'éthyle, acétal, éthanal total, méthanol, butan-2-ol, propan-1-ol,

▼B

butan-1-ol, 2-méthylpropan-1-ol, 2 méthylbutan-1-ol, 3 méthyl-butan-1-ol.

Les données mentionnées ci-après proviennent d'une étude internationale sur les performances de la méthode, réalisée conformément aux procédures agréées au niveau international.

Année de l'essai interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 32

Nombre d'échantillons: 5

Analyte: éthanal

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	28	26	27	27	28
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	2	4	3	3	2
Nombre de résultats acceptés	56	52	54	54	56
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8 (*)	28,6 52,2 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Limite de répétabilité (r) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	12	14	22	6,8	8,9
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Limite de reproductibilité (R) µg/g	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

Année de l'essai interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 32

Nombre d'échantillons: 5

Analyte: acétate d'éthyle

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	24	24	25	24	24
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	2	2	1	2	2
Nombre de résultats acceptés	48	48	50	48	48
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4

▼B

Échantillons	A	B	C	D	E
Limite de répétabilité (r) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Limite de reproductibilité (R) µg/g	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

Année de l'essai interlaboratoire:	1997
Nombre de laboratoires:	32
Nombre d'échantillons:	5
Analyte	acétal

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	20	21	22	17	21
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	4	3	2	4	3
Nombre de résultats acceptés	40	42	44	34	42
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36 6,60 (*)	15,1 28,3 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Limite de répétabilité (r) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Limite de reproductibilité (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

Année de l'essai interlaboratoire:	1997
Nombre de laboratoires:	32
Nombre d'échantillons:	5
Analyte:	éthanal total

▼B

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	23	19	22	21	22
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	1	5	2	3	2
Nombre de résultats acceptés	46	38	44	42	44
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4 15,8 (*)	32,7 61,8 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Limite de répétabilité (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	13	15	24,1	7,3	9,0
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Limite de reproductibilité (R) µg/g	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

Année de l'essai interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 32

Nombre d'échantillons: 5

Analyte: méthanol

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	26	27	27	28	25
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	4	3	3	1	4
Nombre de résultats acceptés	52	54	54	56	50
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Limite de répétabilité (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	13	99	60	4,5	2,8
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Limite de reproductibilité (R) µg/g	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

▼B

Année de l'essai interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 32

Nombre d'échantillons: 4

Analyte: butan-2-ol

Échantillons	A	B	C	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	21	27	29	22
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	4	3	1	3
Nombre de résultats acceptés	42	54	58	44
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	0,40	2,2	0,87	0,64
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Limite de répétabilité (r) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	0,89	13	3,2	0,87
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Limite de reproductibilité (R) µg/g	2,5	35,5	8,9	2,4

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

Année de l'essai interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 32

Nombre d'échantillons: 5

Analyte: propan-1-ol

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	29	27	27	29	29
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	2	4	3	2	2
Nombre de résultats acceptés	58	54	54	58	58
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Limite de répétabilité (r) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Écart-type de reproductibialité (S_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1

▼B

Échantillons	A	B	C	D	E
Limite de reproductibilité (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Types d'échantillons
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

Année de l'essai interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 32

Nombre d'échantillons: 5

Analyte: butan-1-ol

Échantillons	A	B	C
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	20	22	22
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	4	4	6
Nombre de résultats acceptés	40	44	44
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	3,79	5,57	7,54
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	0,43	0,20	0,43
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Limite de répétabilité (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Limite de reproductibilité (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.

Année de l'essai interlaboratoire: 1997

Nombre de laboratoires: 32

Nombre d'échantillons: 5

Analyte: 2-méthylpropan-1-ol

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	28	31	30	26	25
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	3	0	1	5	6
Nombre de résultats acceptés	56	62	60	52	50
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0 246,8 (*)	115,99 133,87 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74

▼B

Échantillons	A	B	C	D	E
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Limite de répétabilité (r) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Limite de reproductibilité (R) µg/g	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

Année de l'essai interlaboratoire:	1997
Nombre de laboratoires:	32
Nombre d'échantillons:	5
Analyte:	2-méthylbutan-1-ol

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	25	26	25	27	25
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	3	2	3	1	2
Nombre de résultats acceptés	50	52	50	54	50
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2 (*)	39,5 61,5 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Limite de répétabilité (r) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Limite de reproductibilité (R) µg/g	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rhum; doubles avec une teneur différente (*).

Année de l'essai interlaboratoire:	1997
Nombre de laboratoires:	32
Nombre d'échantillons:	5
Analyte:	3-méthylbutan-1-ol

▼B

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	23	23	24	27	21
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	5	5	4	1	6
Nombre de résultats acceptés	46	46	48	54	42
Valeur moyenne ($\bar{x}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Écart-type de répétabilité (S_r) µg/g	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Écart-type relative de répétabilité (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Limite de répétabilité (r) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Écart-type de reproductibilité (S_R) µg/g	29,8	13	21	8,5	6,7
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Limite de reproductibilité (R) µg/g	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Types d'échantillons:
A Brandy; doubles en aveugle.
B Kirsch; doubles en aveugle.
C Grappa; doubles en aveugle.
D Whisky; doubles avec une teneur différente (*).
E Rrum; doubles avec une teneur différente (*).

▼M1

V. ANÉTHOLE. DOSAGE DU TRANS-ANÉTHOLE DANS LES BOISSONS SPIRITUEUSES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

1. Champ d'application

Cette méthode convient au dosage du trans-anéthole dans les boissons spiritueuses anisées par chromatographie capillaire en phase gazeuse.

2. Références normatives

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

3. Principe

La concentration en trans-anéthole de la boisson spiritueuse est déterminée par chromatographie en phase gazeuse (GC). Après addition de la même quantité d'un étalon interne, à savoir par exemple le 4-allylanisole (estragole) lorsque l'estragole n'est pas naturellement présent dans l'échantillon, la prise d'essai, d'une part, et une solution titrée de référence contenant le trans-anéthole, d'autre part, toutes deux diluées à l'aide d'éthanol à 45 %, sont injectées directement dans le chromatographe. Pour les boissons spiritueuses à forte concentration en sucres, il y a lieu de procéder à une extraction avant la préparation et l'analyse de l'échantillon.

4. Réactifs et matériaux

Au cours de l'analyse, on utilise exclusivement des réactifs de pureté égale ou supérieure à 98 % et une eau de classe 3 au minimum, répondant à la définition de la norme ISO 3696.

Les substances de référence doivent être conservées au froid (à environ 4 ºC) et à l'abri de la lumière, dans des récipients en aluminium ou des flacons spéciaux pour réactifs en verre teinté (ambré). Les bouchons doivent être équipés, de préférence, d'un opercule d'étanchéité en aluminium. Le trans-anéthole doit être «décongelé» de son état cristallin avant emploi, mais il ne doit en aucun cas être soumis à des températures excédant 35 ºC.

4.1. Éthanol à 96 % vol (CAS 64-17-5)

4.2. 1-methoxy-4- (1-propényl) benzène; (trans-anéthole) (CAS 4180-23-8)

4.3. Étalon interne proposé: 4-allylanisole, (estragole) (CAS 140-67-0)

4.4. Éthanol à 45 % vol

Ajouter 560 g d'eau distillée à 378 g d'éthanol à 96 % vol

4.5. Préparation des solutions étalons

Toutes les substances de référence doivent être conservées à température ambiante (15 à 35 º C) et à l'abri de la lumière, dans des récipients en aluminium ou des flacons spéciaux pour réactifs en verre teinté (ambré). Les bouchons doivent être équipés, de préférence, d'un opercule d'étanchéité en aluminium.

Le trans-anéthole et le 4-allylanisole étant pratiquement non solubles dans l'eau, il est nécessaire de les dissoudre dans un peu d'éthanol à 96 % vol (point 4.1) avant l'addition d'éthanol à 45 % vol (point 4.4).

Les solutions mères doivent être renouvelées chaque semaine.

4.5.1. Solution étalon A

Solution mère de trans-anéthole (concentration: 2 g/l)

Peser 40 mg de trans-anéthole (point 4.2) dans une fiole jaugée de 20 ml (ou 400 mg dans 200 ml, etc.). Ajouter un peu d'éthanol à 96 % vol (point 4.1) et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol (point 4.4). Mélanger soigneusement.

4.5.2. Solution étalon interne B

Solution mère d'étalon interne, par exemple d'estragole (concentration: 2 g/l)

▼M1

Peser 40 mg d'estragole (voir 4.3) dans une fiole jaugée de 20 ml (ou 400 mg dans 200 ml, etc.). Ajouter un peu d'éthanol à 96 % vol (point 4.1) et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol (point 4.4). Mélanger soigneusement.

4.5.3. Solutions servant à contrôler la linéarité de la réponse du détecteur à ionisation de flamme

La linéarité de la réponse du détecteur à ionisation de flamme doit être contrôlée pour l'analyse d'une fourchette de concentrations de trans-anéthole dans les spiritueux de 0 g/l à 2,5 g/l. Lors de la procédure d'analyse, les échantillons inconnus de spiritueux à analyser sont dilués dix fois (point 8.3). Pour les conditions de l'analyse décrites dans la présente méthode, préparer de la façon suivante des solutions mères correspondant à des concentrations de 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 et 0,25 g/l de trans-anéthole dans les échantillons à analyser: prélever à l'aide de pipettes 0,5, 1, 1,5, 2 et 2,5 ml de la solution mère A (point 4.5.1) et introduire ces prélèvements dans autant de fioles jaugées de 20 ml. Dans chacune de ces fioles, introduire à la pipette 2 ml de solution étalon interne B (point 4.5.2) et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol (point 4.4). Mélanger soigneusement.

On utilisera comme solution à 0 g/l la solution à blanc (point 8.4).

4.5.4. Solution étalon C

Introduire à la pipette 2 ml de solution étalon A (point 4.5.1) dans une fiole jaugée de 20 ml, ajouter 2 ml de solution étalon interne B (point 4.5.2) et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol (point 4.4). Mélanger soigneusement.

5. **Appareillage et équipements**

5.1. Chromatographe en phase gazeuse, doté d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un intégrateur ou de tout autre système d'acquisition et de gestion des données pouvant mesurer les aires ou les hauteurs de pic et équipé d'un dispositif automatique d'échantillonnage ou des appareils nécessaires pour l'injection manuelle de l'échantillon.

5.2. Injecteur de type *split/splitless*

5.3. Colonne chromatographique capillaire présentant, à titre d'exemple, les caractéristiques suivantes:

longueur: 50 m,

diamètre intérieur: 0,32 mm,

épaisseur du film: 0,2 µm,

phase stationnaire: type FFAP — polymère poreux à liaison croisée polyéthylène glycol TPA modifié.

5.4. Matériels de laboratoire d'usage courant: verrerie jaugée de précision A, balance de laboratoire (précision: ± 0,1 mg).

6. **Conditions opératoires de la chromatographie en phase gazeuse**

Le type et les dimensions de la colonne ainsi que les conditions opératoires de la chromatographie en phase gazeuse doivent permettre une bonne séparation entre l'anéthole et l'étalon interne ainsi qu'avec tout composé susceptible d'interférer. Les conditions opératoires types pour la colonne présentée à titre d'exemple au point 5.3 sont les suivantes:

6.1. gaz vecteur: hélium de qualité analytique

6.2. débit: 2 ml/mn

6.3. température de l'injecteur: 250 ºC

6.4. température du détecteur: 250 ºC

6.5. conditions de température du four: palier isotherme à 180 ºC pendant 10 minutes

6.6. volume d'injection: 1 µl, split 1:40.

7. **Échantillons**

Les échantillons doivent être entreposés à température ambiante, à l'abri de la lumière et du froid.

▼M1

8. **Mode opératoire**

8.1. Recherche de la présence éventuelle d'estragole dans l'échantillon

Pour vérifier que l'échantillon ne contient pas naturellement de l'estragole, il convient de réaliser une analyse témoin sans addition d'étalon interne. S'il est avéré que l'échantillon contient naturellement de l'estragole, il y a lieu de choisir un autre étalon interne (par exemple, le menthol).

Introduire à la pipette 2 ml d'échantillon dans une fiole jaugée de 20 ml et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol (point 4.4). Mélanger soigneusement.

8.2. Préparation des échantillons inconnus

Introduire à la pipette 2 ml d'échantillon dans une fiole jaugée de 20 ml, puis ajouter 2 ml de solution étalon interne B (point 4.5.2) et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol. (point 4.4). Mélanger soigneusement.

8.3. Analyse témoin

Introduire à la pipette 2 ml de solution étalon interne B (point 4.5.2) dans une fiole jaugée de 20 ml et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol (point 4.4). Mélanger soigneusement.

8.4. Test de linéarité

Avant l'analyse, la linéarité de la réponse du détecteur à ionisation de flamme doit être vérifiée en analysant successivement en triple chacune des solutions titrées servant à contrôler la linéarité (point 4.5.3).

À partir des aires ou hauteurs de pic de l'intégrateur, pour chaque injection, représenter graphiquement la concentration en g/l de la solution mère correspondante en fonction du rapport R.

R = aire ou hauteur de pic du trans-anéthole divisée par l'aire ou la hauteur de pic de l'estragole.

On doit obtenir un tracé linéaire.

8.5. Détermination

Injecter la solution témoin (point 8.3), puis la solution étalon C (point 4.5.4), puis l'un des étalons de linéarité (point 4.5.3) qui servira d'échantillon de contrôle de qualité (à choisir éventuellement en référence à la concentration probable de trans-anéthole dans l'échantillon inconnu), suivi de 5 échantillons inconnus (point 8.2). Pour assurer la stabilité analytique, intercaler un échantillon de contrôle de la linéarité (contrôle de la qualité) après chaque série de cinq échantillons inconnus.

9. **Calcul du facteur de réponse**

Mesurer soit les aires de pic (à l'aide d'un intégrateur ou d'un autre système d'acquisition et de gestion des données), soit les hauteurs de pic (par intégration manuelle) du trans-anéthole et de l'étalon interne.

9.1. Calcul du facteur de réponse (RF_i)

Le facteur de réponse est calculé de la manière suivante:

RFi = (Ci/aire ou hauteur i)*(aire ou hauteur is/Cis)

où:

C_i est la concentration en trans-anéthole de la solution étalon A (point 4.5.1)

C_{is} est la concentration en étalon interne de la solution étalon B (point 4.5.2)

aire $_i$ est l'aire (ou la hauteur) de pic du trans-anéthole

aire $_{is}$ est l'aire (ou la hauteur) de pic de l'étalon interne

Le RF_i est calculé à partir des cinq échantillons de la solution C (point 4.5.4).

9.2. Analyse des solutions titrées servant à contrôler la linéarité de la réponse du détecteur à ionisation de flamme

Injecter les solutions de contrôle de la linéarité (point 4.5.3).

▼M1

9.3. Analyse de l'échantillon

Injecter la solution d'échantillon inconnu (point 8.2)

10. **Calcul des résultats**

La formule à utiliser pour le calcul de la concentration de trans-anéthole est la suivante:

ci = Cis * (aire ou hauteuri/aire ou hauteuris)*Rfi

où:

c_i	est la concentration inconnue de trans-anéthole
C_{is}	est la concentration en étalon interne de l'échantillon inconnu (point 4.5.2)
aire ou $hauteur_i$	est l'aire ou la hauteur de pic du trans-anéthole
aire ou $hauteur_{is}$	est l'aire (ou la hauteur) de pic de l'étalon interne
RF_i	est le coefficient de réponse (calculé comme indiqué au point 9.1)

La teneur en trans-anéthole est exprimée en gramme(s) par litre, avec une décimale.

11. **Assurance et contrôle de la qualité**

Les chromatogrammes doivent présenter une bonne séparation entre l'anéthole et l'étalon interne ainsi qu'avec toute autre substance susceptible d'interférer. La valeur de RF_i est calculée à partir des résultats correspondant aux cinq injections de solution C (point 4.5.4). Si le coefficient de variation (CV % = (écart type/moyenne)*100) se situe autour de 1 %, la valeur moyenne du facteur de réponse RF_i est acceptable.

L'équation visée ci-dessus doit être utilisée pour calculer la concentration en trans-anéthole de l'échantillon choisi pour le contrôle de qualité parmi les solutions de contrôle de la linéarité (point 4.5.3).

Si les résultats moyens calculés à partir de l'analyse de la solution de contrôle de la linéarité choisie comme étalon interne de contrôle de qualité se situent autour de 2,5 % de leur valeur théorique, les résultats obtenus pour les échantillons inconnus sont jugés acceptables.

12. **Traitement des échantillons de spiritueux à forte teneur en sucre et des échantillons de liqueur avant analyse par chromatographie en phase gazeuse**

Extraction d'alcool à partir d'une boisson spiritueuse à forte teneur en sucres, afin de déterminer sa teneur en trans-anéthole par chromatographie capillaire en phase gazeuse.

12.1. Principe

On prélève une partie aliquote de l'échantillon de liqueur, à laquelle on ajoute l'étalon interne, à une concentration similaire à celle de l'analyte (trans-anéthole) présent dans la liqueur. On ajoute ensuite du dodécahydrate de phosphate de sodium et du sulfate d'ammonium anhydre. Le mélange est alors bien remué et réfrigéré. Deux phases se séparent et la phase alcoolique supérieure est récupérée. Une partie aliquote de cette phase alcoolique est prélevée et diluée à l'aide d'une solution d'éthanol à 45 % vol (point 4.4). Il convient de noter qu'on n'ajoute pas d'étalon interne à ce stade, puisque cela a déjà été fait. La solution obtenue est prête à être analysée par chromatographie en phase gazeuse.

12.2. Réactifs et matériaux

Au cours de l'extraction, utiliser uniquement des réactifs d'une pureté supérieure à 99 %.

12.2.1. Sulfate d'ammonium anhydre (CAS 7783-20-2)

12.2.2. Dodécahydrate de phosphate de sodium dibasique (CAS 10039-32-4).

12.3. Appareillage et équipements

Fioles coniques, flacons séparateurs, réfrigérateur.

▼M1

12.4. Mode opératoire

12.4.1. Recherche d'estragole dans l'échantillon

Pour vérifier que l'échantillon ne contient pas d'estragole d'origine naturelle, il convient d'analyser un prélèvement témoin (point 12.6.2) sans addition d'étalon interne. S'il est avéré que l'échantillon contient naturellement de l'estragole, il y a lieu de choisir un autre étalon interne.

12.4.2. Extraction

Introduire à la pipette 5 ml d'éthanol à 96 % vol (point 4.1) dans une fiole conique, puis y ajouter successivement 50 mg d'étalon interne (point 4.3) et 50 ml d'échantillon. Ajouter 12 g de sulfate d'ammonium anhydre (point 12.2.1) et 8,6 g de dodécahydrate de phosphate de sodium dibasique (point 12.2.2). Boucher la fiole conique.

Agiter la fiole pendant au moins trente minutes. Il est possible d'utiliser un dispositif d'agitation mécanique, mais pas un agitateur magnétique à revêtement en téflon, car le téflon absorbe une partie de l'analyte. Noter que les sels ajoutés ne se dissoudront pas complètement.

Placer la fiole bouchée dans un réfrigérateur ($T < 5$ ºC) pendant au moins deux heures.

Après cela, on devrait observer deux couches distinctes en phase liquide et un résidu solide. La couche d'alcool doit être claire; si ce n'est pas le cas, remettre la fiole au froid jusqu'à ce qu'on observe une séparation nette.

Une fois obtenue une couche d'alcool claire, en prélever avec précaution une partie aliquote (10 ml, par exemple), en ayant soin de ne pas troubler la couche aqueuse, puis la verser dans un flacon en verre ambré et reboucher soigneusement.

12.4.3. Préparation de l'extrait d'échantillon à analyser

Attendre que l'extrait (point 12.4.2) soit à température ambiante.

Prélever 2 ml de la couche d'alcool de l'extrait d'échantillon à température ambiante, l'introduire à la pipette dans une fiole jaugée de 20 ml, porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol (point 4.4) et mélanger soigneusement.

12.5. Détermination

Suivre la procédure exposée au point 8.5.

12.6. Calcul des résultats

Utiliser la formule suivante pour calculer les résultats:

Ci =(mis/V)*(airei/aireis)*Rfi

où:

m_{is} est la masse d'étalon interne (point 4.3) prélevé (point 12.4.2), exprimée en milligrammes

V est le volume de l'échantillon inconnu (50 ml)

RF_i est le facteur de réponse (point 9.1)

$aire_i$ est l'aire de pic du trans-anéthole

$aire_{is}$ est l'aire de pic de l'étalon interne

Les résultats sont exprimés en grammes par litre, avec une décimale.

12.7. Assurance et contrôle de la qualité

Suivre la procédure exposée au point 11.

13. **Caractéristiques de performance de la méthode (précision)**

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoires

Les tableaux visées ci-après exposent les valeurs concernant l'anéthole.

Les données présentées proviennent d'une étude internationale sur les performances de la méthode, réalisée conformément aux procédures agréées au niveau international.

▼**M1**

Année de l'essai interlaboratoires: 1998

Nombre de laboratoires: 16

Nombre d'échantillons: 10

Analyte: anéthole

Pastis:

Échantillons	A	B	C	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	15	15	15	13	16	16
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	1	1	1	3	—	—
Nombre de résultats acceptés	30	30	30	26	16	16
Valeur moyenne g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Écart type de répétabilité (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Écart type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Limite de répétabilité (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Écart type de reproductibilité (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Écart type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limite de reproductibilité (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Types d'échantillons

A pastis, doubles en aveugle

B pastis, doubles en aveugle

C pastis, doubles en aveugle

D pastis, doubles en aveugle

E pastis, échantillon unique

F pastis, échantillon unique

Autres boissons spiritueuses anisées:

Échantillons	G	H	I	J
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	16	14	14	14
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	—	2	1	1
Nombre de résultats acceptés	32	28	28	28
Valeur moyenne g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Écart type de répétabilité (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Écart type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Limite de répétabilité (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Écart type de reproductibilité (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Écart type relatif de répétabilité (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limite de reproductibilité (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

▼**M1**

Types d'échantillons

G ouzo, doubles, à deux niveaux de concentration (*)

H anis, doubles en aveugle

I liqueur anisée, doubles

J liqueur anisée, doubles.

▼M1

VI. ACIDE GLYCYRRHIZIQUE. DOSAGE DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

1. **Domaine d'application**

Cette méthode convient au dosage de l'acide glycyrrhizique dans les boissons spiritueuses anisées par chromatographie liquide à haute performance. Le règlement (CEE) nº 1576/89 précise qu'une boisson spiritueuse relevant de la dénomination «Pastis» doit présenter une teneur en acide glycyrrhizique comprise entre 0,05 g/l et 0,5 g/l.

2. **Références normatives**

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

3. **Principe**

La teneur en acide glycyrrhizique est déterminée en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec détection UV. Après filtration, on injecte séparément, directement dans le système CLHP, une solution étalon et l'échantillon test.

4. **Réactifs et matériaux**

Au cours de l'analyse, on utilise exclusivement des réactifs adaptés à la chromatographie liquide à haute performance, de l'éthanol absolu et une eau de classe 3, répondant à la définition de la norme ISO 3696.

4.1. Éthanol à 96 % vol (CAS 64-17-5)

4.2. Glycyrrhizinate monoammoniacal, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (sel d'acide glycyrrhizique monoammoniacal)

(Masse molaire: 839,98) (CAS 53956-04-0): pureté minimale de 90 %

(Masse molaire de l'acide glycyrrhizique: 822,94)

4.3. Acide acétique cristallisable CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.4. Méthanol CH_3OH (CAS 67-56-1)

4.5. Éthanol à 50 % vol

Pour 1 000 ml à 20 ºC:

— éthanol à 96 % vol (point 4.1): 521 ml

— eau (point 2.0): 511 ml.

4.6. Préparation des solutions d'élution pour chromatographie liquide à haute performance

4.6.1. Solvant d'élution A (exemple)

80 volumes d'eau (point 2.0)

20 volumes d'acide acétique (point 4.3)

Dégazer le solvant d'élution durant cinq minutes.

NB: si l'eau utilisée n'est pas microfiltrée, il est souhaitable de filtrer le solvant d'élution à l'aide d'un filtre pour solvants organiques dont le diamètre des pores est inférieur ou égal à 0,45 µm.

4.6.2. Solvant d'élution B

Méthanol (point 4.4)

4.7. Préparation des solutions étalons

Toutes les solutions étalons doivent être renouvelées tous les deux mois.

4.7.1. Solution de référence C

Peser, à 0,1 mg près, 25 mg de glycyrrhizinate monoammoniacal (point 4.2) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre le glycyrrhizinate monoammoniacal dans de l'éthanol à 50 % vol (point 4.5). Après dissolution, compléter au trait de jauge avec une nouvelle quantité d'éthanol à 50 % vol (point 4.5).

▼M1

Filtrer à l'aide d'un filtre pour solvants organiques.

4.7.2. Solutions étalons (utilisées pour vérifier la linéarité de la réponse des instruments)

Préparer une solution mère en pesant à 0,1 mg près, 100 mg de glycyrrhizinate monoammoniacal dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter un peu d'éthanol à 50 % vol et dissoudre le glycyrrhizinate monoammoniacal. Après dissolution, compléter au trait de jauge avec une nouvelle quantité d'éthanol à 50 % vol (point 4.5).

Préparer au moins quatre autres solutions correspondant à 0,05, 0,1, 0,25 et 0,5 g/l de glycyrrhizinate monoammoniacal en prélevant respectivement 5 ml, 10 ml, 25 ml et 50 ml de la solution mère dans des fioles jaugées séparées de 100 ml. Compléter ensuite au trait de jauge avec une nouvelle quantité d'éthanol à 50 % vol (point 4.5) et mélanger soigneusement.

Filtrer toutes les solutions à l'aide d'un filtre pour solvants organiques.

5. **Appareillage et équipements**

5.1. Système de séparation

5.1.1. Chromatographe en phase liquide à haute performance

5.1.2. Système de pompage permettant l'obtention et le maintien d'un débit constant ou programmé à haute pression

5.1.3. Système de détection par spectrophotométrie dans le domaine de l'UV, à régler sur une longueur d'onde de 254 nm

5.1.4. Système de dégazage des solvants

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

5.3. Colonne (exemple):

matériau: acier inoxydable ou verre

diamètre intérieur: 4 à 5 mm

longueur: 100 à 250 mm

phase stationnaire: silice greffée avec groupement fonctionnel octadécyle (C18), de préférence sphérique, de granulométrie égale au maximum à 5 µm

5.4. Équipement de laboratoire

5.4.1. Balance de laboratoire (précision: 0,1 mg)

5.4.2. Verrerie jaugée de précision (classe A)

5.4.3. Dispositif de filtration pour petits volumes sur micromembrane

6. **Conditions de la chromatographie**

6.1. Caractéristiques d'élution (exemple):

— débit d'éluant: 1 ml/minute

— solvant A = 30 %

— solvant B = 70 %.

6.2. Détection

— UV = 254 nm.

7. **Mode opératoire**

7.1. Préparation de l'échantillon de boisson spiritueuse

Filtrer, si nécessaire, à travers un filtre pour solvants organiques (diamètre des pores égal à 0,45 µm).

7.2. Détermination

Après stabilisation des conditions chromatographiques:

— injecter 20 µl de la solution de référence C (point 4.7.1)

▼M1

— injecter 20 µl de l'échantillon test

— comparer les deux chromatogrammes obtenus. Identifier les pics de l'acide glycyrrhizique suivant leur temps de rétention. Mesurer leurs aires (ou hauteurs) et calculer la concentration en g/l, jusqu'à deux décimales, en appliquant l'équation suivante:

$$c = C \times \frac{h \times P \times 823}{H \times 100 \times 840}$$

où:

c est la concentration d'acide glycyrrhizique en gramme(s) par litre dans la boisson spiritueuse analysée

C est la concentration de glycyrrhizinate monoammoniacal en gramme(s) par litre dans la solution de référence

h est la surface (ou hauteur) du pic de l'acide glycyrrhizique de la boisson spiritueuse analysée

H est la surface (ou hauteur) du pic de l'acide glycyrrhizique de la solution de référence

P est la pureté du glycyrrhizinate monoammoniacal utilisé comme substance de référence (en %)

823 est la masse molaire de l'acide glycyrrhizique

840 est la masse molaire du glycyrrhizinate monoammoniacal.

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

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoires

Le tableau visé ci-après présente les valeurs obtenues pour l'acide glycyrrhizique.

Les données présentées proviennent d'une étude internationale sur les performances de la méthode, réalisée conformément aux procédures agréées au niveau international.

Année de l'essai interlaboratoires: 1998

Nombre de laboratoires: 16

Nombre d'échantillons: 5

Analyte: acide glycyrrhizique

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	13	14	15	16	16
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	3	2	1	—	—
Nombre de résultats acceptés	26	28	30	32	32
Valeur moyenne g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Écart type de répétabilité (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Écart type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Limite de répétabilité (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Écart type de reproductibilité (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Écart type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Limite de reproductibilité (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Types d'échantillons

A pastis, doubles en aveugle

▼**M1**

B pastis, doubles, à deux niveaux de concentration (*)

C pastis, doubles en aveugle

D pastis, doubles en aveugle

E pastis, doubles en aveugle

▼M1

VII. CHALCONES. MÉTHODE DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE POUR VÉRIFIER LA PRÉSENCE DE CHALCONES DANS LE PASTIS

1. **Champ d'application**

Cette méthode convient pour déterminer si des boissons anisées contiennent ou non des chalcones. Les chalcones sont des substances colorantes naturelles de la famille des flavonoïdes présentes dans le bois de réglisse (*Glycyrrhiza glabra*).

Pour qu'une boisson spiritueuse anisée puisse être dénommée «Pastis», la présence de chalcones est obligatoire [règlement (CEE) nº 1576/89].

2. **Références normatives**

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

3. **Principe**

Dans une solution d'extrait de réglisse de référence préparée à cet effet, on établit la présence ou l'absence de chalcones par chromatographie liquide à haute performance avec détection UV.

4. **Réactifs et matériaux**

Au cours de l'analyse, on utilise exclusivement des réactifs adaptés à la chromatographie liquide à haute performance. L'éthanol employé doit titrer 96 % vol. L'eau employée doit être exclusivement de classe 3 (conforme à la définition de la norme ISO 3696).

4.1. Éthanol à 96 % vol (CAS 64-17-5)

4.2. Acétonitrile CH_3CN, (CAS 75-05-8)

4.3. Substance de référence: *Glycyrrhiza glabra* (réglisse)

Bois de réglisse (*Glycyrrhiza Glabra*) broyé grossièrement. Dimension moyenne des particules, de type «bâtonnet»: longueur 10 à 15 mm; épaisseur: 1 à 3 mm.

4.4. Acétate de sodium CH_3COONa, (CAS 127-09-3)

4.5. Acide acétique cristallisable CH_3COOH, (CAS 64-19-7)

4.6. Préparation des solutions

4.6.1. Éthanol à 50 % vol

Pour 1 000 ml à 20 ºC:

— éthanol à 96 % vol (point 4.1): 521 ml
— eau (point 2.0): 511 ml.

4.6.2. Solvant A: acétonitrile

Acétonitrile (point 4.2) de pureté analytique CLHP.

Dégazer

4.6.3. Solvant B: 0,1 M d'une solution tampon d'acétate de sodium de pH 4,66

Dans une fiole jaugée, introduire 8,203 g d'acétate de sodium (point 4.4), ajouter 6,005 g d'acide acétique cristallisable (point 4.5) et porter à 1 000 ml avec de l'eau (point 2).

5. **Préparation de l'extrait de référence de *Glycyrrhiza glabra* (point 4.3)**

5.1. Peser 10 g de bois de réglisse broyé (*Glycyrrhiza glabra*, point 4.3) et les placer dans un ballon de distillation.

— Ajouter 100 ml d'éthanol à 50 % vol (point 4.6.1)
— Distiller sous reflux pendant une heure
— Filtrer
— Réserver le filtrat pour une utilisation ultérieure.

5.2. Récupérer l'extrait de bois de réglisse présent dans le filtre.

— Placer dans un ballon de distillation

▼**M1**

— Ajouter 100 ml d'éthanol à 50 % vol (point 4.6.1).

— Distiller sous reflux pendant une heure

— Filtrer. Réserver le filtrat pour une utilisation ultérieure.

5.3. L'extraction du bois de réglisse doit être effectuée à trois reprises successives.

5.4. Réunir les trois filtrats.

5.5. Évaporer la phase solvant (du point 5.4) à l'aide d'un évaporateur de type rotatif.

5.6. Récupérer l'extrait résiduel (du point 5.5) à l'aide de 100 ml d'éthanol à 50 % vol (point 4.6.1).

6. **Appareillage et équipements**

6.1. Système de séparation

6.1.1. Chromatographe en phase liquide à haute performance

6.1.2. Système de pompage permettant l'obtention et le maintien d'un débit constant ou programmé à haute pression

6.1.3. Système de détection par spectrophotométrie dans l'UV/le visible, pouvant être réglé aux longueurs d'onde de 254 et 370 nm

6.1.4. Système de dégazage des solvants

6.1.5. Four à colonne pouvant être réglé à la température de 40 ºC [± 0,1) ºC]

6.2. Intégrateur-calculateur ou enregistreur dont les performances sont compatibles avec l'ensemble du système de séparation

6.3. Colonne:

matériau: acier inoxydable ou verre

diamètre intérieur: 4 à 5 mm

phase stationnaire: silice greffée avec groupe fonctionnel dérivé octadécyle C 18, de granulométrie maximale 5 µm (phase greffée).

6.4. Matériel courant de laboratoire et notamment:

6.4.1. balance analytique (précision: ± 0,1 mg)

6.4.2. appareil de distillation équipé d'un condenseur à reflux comportant, à titre d'exemple:

— un ballon de 250 ml de capacité, à rodage normalisé

— un condenseur à reflux d'une longueur de 30 cm

— un dispositif de chauffage (toute pyrogénation des matières extractives doit être évitée à l'aide d'un dispositif approprié)

6.4.3. Appareil d'évaporation de type rotatif

6.4.4. Dispositif de filtration (entonnoir dit de Büchner, par exemple)

6.5. Conditions de la chromatographie (à titre d'exemple)

6.5.1. Caractéristiques d'élution solvant A (point 4.6.2)/solvant B (point 4.6.3):

— gradient de 20/80 (v/v) à 50/50 (v/v) en 15 minutes

— gradient de 50/50 (v/v) à 75/25 (v/v) en 5 minutes

— isocratique à 75/25 (v/v) durant 5 minutes

— stabilisation de la colonne entre deux injections

— isocratique 20/80 (v/v) durant 5 minutes.

6.5.2. Débit d'éluant: 1 ml/minute

6.5.3. Paramétrage du détecteur à UV

Le détecteur doit être réglé sur 370 nm pour détecter la présence de chalcones, puis sur 254 nm pour détecter l'acide glycyrrhizique.

NB: le changement de longueur d'onde (de 370 nm à 254 nm) doit être effectué 30 s avant le début du pic d'élution de l'acide glycyrrhizique.

▼M1

7. **Mode opératoire**

7.1. Préparation de l'échantillon de boisson spiritueuse

Filtration à travers un filtre pour solvants organiques (diamètre des pores égal à 0,45 µm)

7.2. Préparation de l'extrait résiduel de réglisse (point 5.6)

Avant analyse, procéder à une dilution au dixième dans de l'éthanol à 50 % vol (point 4.6.1).

7.3. Détermination

7.3.1. Injecter 20 µl de l'extrait de bois de réglisse préparé (point 7.2). Effectuer l'analyse dans les conditions chromatographiques décrites précédemment (point 6.5).

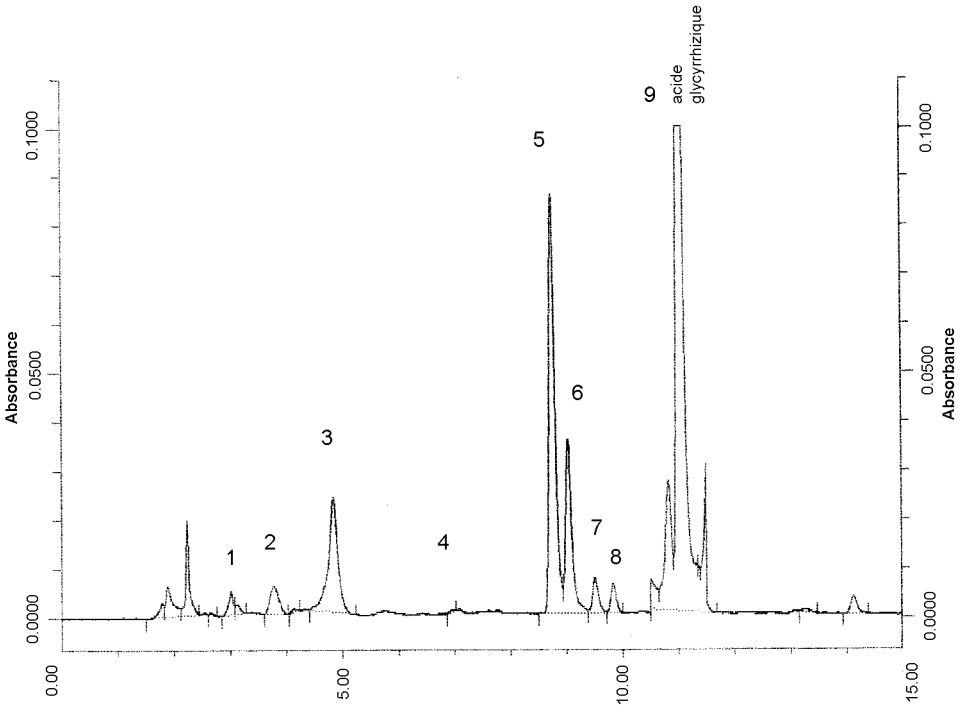
7.3.2. Injecter 20 µl de l'échantillon test (boisson spiritueuse anisée, point 7.1). Effectuer l'analyse dans les conditions chromatographiques décrites précédemment (point 6.5).

7.3.3. Comparer les deux chromatogrammes obtenus. Il doit exister une bonne similitude entre les deux chromatogrammes dans la zone de sortie des chalcones (au cours de la détection à 370 nm dans les conditions d'analyse décrites précédemment). Voir la figure 1.

8. **Chromatogramme caractéristique d'un pastis**

Figure 1

Chromatogramme réalisé selon la méthode décrite ci-dessus, montrant la présence de chalcones dans un pastis. Les pics 1 à 8 correspondent aux chalcones et le pic 9 à l'acide glycyrrhizique.



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

Résultats de l'essai interlaboratoires

Le tableau visé ci-après présente les caractéristiques de performance pour l'identification de la présence ou de l'absence de chalcones dans les pastis et les boissons spiritueuses anisées.

Les données présentées proviennent d'une étude internationale sur les performances de la méthode, réalisée conformément aux procédures agréées au niveau international.

Année de l'essai interlaboratoires: 1998

▼**M1**

Nombre de laboratoires: 14

Nombre d'échantillons 11

Analyte: chalcones

Échantillons	A	B	C	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	14	14	14	14	14	13
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	—	—	—	—	—	1 (*)
Nombre de résultats acceptés	28	14	14	28	28	26
Nombre de résultats révélant la présence de chalcones	28	14	14	0	28	0
Nombre de résultats révélant l'absence de chalcones	0	0	0	28	0	26
Pourcentage de résultats corrects (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Incompatibles des résultats entre les doubles, attribuée à une erreur d'échantillonnage.

Échantillons	G	H	I	J	K
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	14	14	14	14	14
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	—	—	—	—	—
Nombre de résultats acceptés	28	14	14	28	28
Nombre de résultats révélant la présence de chalcones	0	0	0	0	0
Nombre de résultats révélant l'absence de chalcones	28	14	14	28	28
Pourcentage de résultats corrects (%)	100	100	100	100	100

Types d'échantillons

A pastis, en double aveugle

B pastis, échantillon unique

C pastis, échantillon unique

D «pastis» (sans chalcones), en double aveugle

E «pastis» (sans chalcones), en double aveugle

F liqueur anisée (sans chalcones), en double aveugle

G liqueur anisée (sans chalcones), doubles en aveugle

H ouzo (sans chalcones), échantillon unique

I ouzo (sans chalcones), échantillon unique

J anis (sans chalcones), doubles en aveugle

K «pastis» (sans chalcones), doubles en aveugle.

▼M1

IX. JAUNE D'ŒUF. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN JAUNE D'ŒUF DES BOISSONS SPIRITUEUSES PAR LA MÉTHODE PHOTOMÉTRIQUE

1. Champ d'application

Cette méthode convient pour la détermination d'une teneur en jaune d'œuf de 40 à 250 g/l dans les liqueurs à base d'œuf et les liqueurs aux œufs.

2. Références normatives

ISO 3696:1897 Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai

3. Principe

Les composés phosphorés solubles dans l'éthanol, présents dans le jaune d'œuf, sont extraits et déterminés par voie photométrique sous forme de complexe molybdate de phosphore.

4. Réactifs

4.1. Eau bidistillée

4.2. Terre d'infusoires

4.3. Éthanol 96 % vol (CAS 64-17-5)

4.4. Solution à 15 % d'acétate de magnésium (CAS 16674-78-5)

4.5. Acide sulfurique à 10 % (CAS 7664-93-9)

4.6. Acide sulfurique 1N

4.7. Solution de dihydrogénophosphate de potassium (CAS 778-77-0), KH_2PO_4, à 0,16 g/l

4.8. Réactif pour la détermination du phosphate:

20 g de molybdate d'ammonium (CAS 12054-85-2), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ sont dissous dans 400 ml d'eau à 50 ºC.

Dans un autre récipient, dissoudre 1 g de vanadate d'ammonium (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3, dans 300 ml d'eau chaude et l'on ajoute, après refroidissement, 140 ml d'acide nitrique concentré (CAS 7697-37-2). Les solutions refroidies sont réunies dans une fiole jaugée de 1 000 ml et complétées jusqu'au repère volumétrique.

5. Appareillage et matériel

5.1. Fiole conique de 100 ml

5.2. Bain ultrasonique (ou agitateur magnétique)

5.3. Fiole conique de 100 ml

5.4. Bain-marie à 20 ºC

5.5. Filtre (Whatman nº 4 ou équivalent)

5.6. Creuset de porcelaine (ou de platine)

5.7. Bain-marie bouillant

5.8. Plaque chauffante

5.9. Four à moufle

5.10. Fiole jaugée de 50 ml

5.11. Fiole jaugée de 20 ml

5.12. Spectrophotomètre réglé sur 420 nm

5.13. Cuvette de 1 cm.

6. Échantillons

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

▼M1

7. **Mode opératoire**

7.1. Préparation des échantillons

7.1.1. On introduit 10 g d'échantillon dans une fiole conique de 100 ml (point 5.1).

7.1.2. 70 ml d'éthanol y sont ajoutés progressivement et par petites fractions, en remuant bien à chaque addition. Le mélange est placé dans un bain ultrasonique (point 5.2) pendant 15 minutes [ou remué à l'aide d'un agitateur magnétique (point 5.2) pendant 10 minutes, à température ambiante].

7.1.3. Le contenu de la fiole est transvasé dans une fiole jaugée de 100 ml (point 5.3) et additionné des volumes d'éthanol utilisés pour le rinçage (point 4.3). Compléter avec de l'éthanol (point 4.3) jusqu'au trait de jauge, puis placer les fioles dans un bain-marie à 20 º C (point 5.4). Toujours à 20 ºC, ajuster au trait de jauge.

7.1.4. Filtrer (point 5.5) après addition d'une petite quantité de terre d'infusoires (point 4.2), en rejetant les 20 premiers millilitres.

7.1.5. Transvaser 25 ml du filtrat ainsi obtenu dans un creuset de porcelaine ou de platine (point 5.6). Le filtrat doit ensuite être concentré par évaporation douce au bain-marie (point 5.7), après addition de 5 ml d'une solution d'acétate de magnésium à 15 % (point 4.4).

7.1.6. Placer les creusets sur une plaque chauffante (point 5.8) et les laisser à chauffer jusqu'à ce qu'ils soient à peine secs.

7.1.7. Le résidu sec calciné est porté à l'incandescence dans un four à moufle (point 5.9) réglé sur une température de 600 ºC, et ce jusqu'à l'obtention de cendres blanches. L'opération dure au minimum 1 heure et demie, mais peut se prolonger toute une nuit.

7.1.8. Les cendres sont reprises à l'aide de 10 ml d'acide sulfurique à 10 % (point 4.5) et transférées au moyen de rinçages d'eau distillée (point 4.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (point 5.10). Celle-ci est complétée avec de l'eau distillée jusqu'au repère volumétrique, à température ambiante. Une partie aliquote de 5 ml de cette solution de cendre est réservée à la préparation de la solution test à utiliser pour le dosage photométrique des phosphates.

7.2. Dosage photométrique des phosphates

7.2.1. Solution comparative

7.2.1.1. Introduire 10 ml d'acide sulfurique à 10 % (point 4.5) dans une fiole jaugée de 50 ml (point 5.10) et compléter jusqu'au repère volumétrique à l'aide d'eau distillée (point 4.1).

7.2.1.2. Dans une fiole jaugée de 20 ml (point 5.11), introduire une partie aliquote de 5 ml de cette solution (point 7.2.1.1), puis ajouter 1 ml d'acide sulfurique 1 N (point 4.6) et 2 ml de réactif au phosphate (point 4.8). Porter à l'aide d'eau distillée (point 4.1) jusqu'à un volume de 20 ml.

7.2.1.3. Fermer sans enfoncer hermétiquement le bouchon, agiter et chauffer pendant 10 mn dans un bain d'eau à ébullition (point 5.7), puis laisser refroidir pendant 20 minutes dans un bain-marie à 20 ºC (point 5.4).

7.2.1.4. Verser la solution comparative ainsi obtenue dans une cuvette de 1 cm (point 5.13).

7.2.2. Solution d'échantillon

7.2.2.1. Dans une fiole jaugée de 20 ml (point 5.11), introduire une partie aliquote de 5 ml de la solution de cendres (point 7.1.8), puis ajouter 1 ml d'acide sulfurique 1 N (point 4.6) et 2 ml de réactif au phosphate (point 4.8). Porter à l'aide d'eau distillée (point 4.1) jusqu'à un volume de 20 ml.

7.2.2.2. Fermer sans enfoncer hermétiquement le bouchon, agiter et chauffer pendant 10 mn dans un bain d'eau à ébullition (point 5.7), puis laisser refroidir pendant 20 minutes dans un bain-marie à 20 ºC (point 5.4).

7.2.2.3. La solution jaune qui se forme est placée dans une cuvette de 1 cm (point 5.13) et fait immédiatement l'objet, dans un spectrophotomètre à 420 nm (point 5.12), d'une analyse comparée avec la solution de référence (point 7.2.1.4).

▼M1

7.2.3. Courbe d'étalonnage

7.2.3.1. Pour établir la courbe d'étalonnage, introduire des parties aliquotes de 2 ml du réactif au phosphate (point 4.8) dans des fioles volumétriques de 20 ml (point 5.11) contenant chacune 1 ml d'acide sulfurique 1 N (point 4.6) et, respectivement, 0, 2, 4, 6, 8, et 10 ml de solution de dihydrogénophosphate de potassium (point 4.7). Compléter à l'aide d'eau distillée (point 4.1) jusqu'au repère volumétrique des 20 ml.

7.2.3.2. Fermer sans enfoncer hermétiquement le bouchon, agiter et chauffer pendant 10 mn dans un bain d'eau à ébullition (point 5.7), puis laisser refroidir pendant 20 minutes dans un bain-marie à 20 ºC (point 5.4). La solution est ensuite placée dans une cuvette de 1 cm (point 5.13) et fait l'objet, dans un spectrophotomètre à 420 nm (point 5.12), d'une analyse comparée avec la solution de référence (point 7.2.1.4).

7.2.3.3. Établissement de la courbe d'étalonnage

Solution de dihydrogénophosphate (ml)	0	2	4	6	8	10
P_2O_5 (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. **Expression des résultats**

La teneur en jaune d'œuf, exprimée en g/l, est calculée selon la formule suivante:

$$\text{g/l jaune d'œuf} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{masse volumique}}{E/40}$$

où:

110	est le facteur de conversion pour la quantité totale de P_2O_5 en g dans 100 g de jaune d'œuf
mg P_2O_5	est la valeur déterminée par la courbe d'étalonnage
masse volumique	est la masse volumique (en g/ml) de la liqueur aux œufs à la température de 20 ° C
E	est le poids de liqueur aux œufs en g
40	est le facteur de dilution pour une partie aliquote de 5 ml de solution de cendres.

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

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoires:

L tableau ci-après présente les valeurs obtenues pour le jaune d'œuf.

Les données présentées proviennent d'une étude internationale sur les performances de la méthode, réalisée conformément aux procédures agréées au niveau international.

Année de l'essai interlaboratoires:	1998
Nombre de laboratoires:	24
Nombre d'échantillons:	5
Analyte:	jaune d'œuf

Échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	19	20	22	20	22
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	3	4	2	4	2
Nombre de résultats acceptés	38	40	44	40	44

▼**M1**

Échantillons	A	B	C	D	E
Valeur moyenne	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Écart type de répétabilité (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Écart type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Limite de répétabilité (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Écart type de reproductibilité (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Écart type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Limite de reproductibilité (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Types d'échantillons:

A Advocaat, doubles en aveugle

B Advocaat, doubles en aveugle

C Advocaat, doubles en aveugle

D Advocaat (dilué), doubles, avec deux niveaux de concentration (*)

E Advocaat, doubles en aveugle