

Organisation Internationale de la Vigne et du Vin

RÉSOLUTIONS **de la 7^{ème} ASSEMBLÉE GÉNÉRALE**

(adoptées par consensus)



Zagreb (Croatie) – 3 juillet 2009



Résumé des Résolutions adoptées par la 7^{ème} Assemblée générale de l'OIV - Zagreb (Croatie)

La 7^{ème} Assemblée générale de l'Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV), tenue à Zagreb (Croatie), a adopté au total 37 résolutions. Ce résumé des principales résolutions a pour objet de donner aux lecteurs un aperçu des décisions les plus importantes prises par l'Assemblée générale de l'OIV.

Décisions concernant le règlement de l'OIV

L'Assemblée Générale de l'OIV a décidé par consensus de modifier les dispositions générales du règlement intérieur, afin de permettre aux organisations internationales intergouvernementales composées d'Etats souverains de disposer d'un droit d'option pour solliciter un statut particulier. **(Résolution OIV/Comex 05/2009).**

L'assemblée générale a adopté les lignes directrices qui définissent les critères d'octroi du patronage de l'OIV pour les concours de vins et de boissons spiritueuses d'origine vitivinicole. Afin de bénéficier du patronage de l'OIV, les organisateurs de concours internationaux doivent respecter la nouvelle norme de l'OIV pour les concours internationaux des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole et ces lignes directrices au moment de la demande. **(Résolution OIV/Concours 332B/2009).**

Décision concernant la norme OIV des concours

L'Assemblée générale a également décidé de remplacer la norme OIV des concours internationaux des vins, adoptée en 1994, et la norme des concours internationaux de boissons spiritueuses d'origine vitivinicole, adoptée en 1999, par une nouvelle norme. Cette norme s'applique aux concours qui sollicitent le patronage de l'OIV dont les conditions d'octroi sont définies par les lignes directrices prévues au Règlement intérieur de l'OIV. Cette nouvelle norme prend en compte les évolutions des Concours internationaux et valide une fiche unique de dégustation réalisée en coopération avec l'Union internationale des œnologues. **(Résolution OIV/Concours 332A/2009).**

Décision concernant la Viticulture

La 7^{ème} Assemblée générale a approuvé une résolution relative à un protocole d'évaluation des vignes obtenues par transformation génétique. Des travaux de recherche, menés dans plusieurs pays, visant à améliorer les variétés de vignes existantes par des approches transgéniques sont en train de produire des vignes génétiquement modifiées (« vignes GM »). Cette résolution recommande aux Etats-membres d'adapter et, le cas échéant, d'intégrer les lignes directrices contenues dans ce protocole conformément à leur régime réglementaire. Ce protocole intègre les bases et les objectifs généraux pour l'évaluation de vignes transgéniques ainsi que l'utilisation commerciale d'une vigne génétiquement modifiée. **(Résolution OIV/Viti 355/2009).**

Décisions concernant les pratiques œnologiques

Parmi les décisions adoptées par l'Assemblée Générale, plusieurs résolutions concernent de nouvelles pratiques œnologiques qui viendront compléter le Code international des pratiques œnologiques de l'OIV, en particulier :

- Le traitement par le chlorure d'argent afin de réduire les défauts olfactifs dûs à l'hydrogène sulfuré et à certains mercaptans. La dose utilisée ne doit pas dépasser 1g/hl. Le précipité doit être éliminé par sédimentation et/ou filtration et la teneur limite en argent dans les vins doit être inférieure à 0,1 mg/l. Les résidus doivent être traités par une filière spécialisée dans le traitement des résidus. **(Résolution OIV/Oeno 145/2009).**
- La macération de raisins passerillés ou de leur marc sur un vin. Cette nouvelle pratique a notamment pour objectif d'augmenter le contenu du vin en sucres, en composés phénoliques et en composés aromatiques. **(Résolution OIV/Oeno 278/2009).** En parallèle, une fiche générale sur la macération a été adoptée regroupant ainsi les différentes techniques admises dans ce domaine. **(Résolution OIV/Oeno 196/2009).**
- Le collage des moûts et des vins par le chitosane ou le chitine glucane d'origine fongique. L'objectif de ces pratiques est d'admettre ces deux composés pour les moûts et les vins afin de faciliter le débouillage et la clarification ainsi que de réaliser un traitement préventif des casses protéiques pour les moûts **(Résolution OIV/Oeno 336A/2009, OIV/Oeno 336B/2009)** et pour les vins, de réduire la turbidité en précipitant les particules en suspension et de réaliser un traitement préventif des casses protéiques **(Résolution OIV/Oeno 337A/2009, OIV/Oeno 337B/2009)**. Ces deux composés seront aussi ajoutés dans la liste des produits de collage admis **(Résolution OIV/Oeno 339A/2009, OIV/Oeno 339B/2009).**
- De même, le traitement des vins par le chitine glucane d'origine fongique a pour objectif de réduire les teneurs en métaux lourds notamment en fer, plomb, cadmium et cuivre, prévenir la casse ferrique et cuivreuse, réduire des contaminants éventuels, en particulier l'ochratoxine A. En plus de ces objectifs, le traitement avec le chitosane, également adopté, permet de réduire les micro-organismes indésirables notamment les *Brettanomyces*. Des doses maximales d'utilisation sont fixées en fonction des objectifs à atteindre. **(Résolution OIV/Oeno 338A/2009, OIV/Oeno 338B/2009).**

Décisions concernant les spécifications des produits œnologiques

Un certain nombre des décisions concernent des monographies qui viennent compléter le Codex Œologique International, en particulier :

- Une nouvelle monographie qui concerne les enzymes hemicellulases. Elles sont utilisées lors de la macération du raisin. Cette activité peut être estimée par l'hydrolyse des galactanes de pomme de terre. Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées d'*Aspergillus niger* et/ou de mélange *Aspergillus niger* – *Trichoderma reesei*. Cette monographie précise l'objet, l'origine et le champ d'application ainsi que les critères de pureté et la méthode de détermination de l'activité enzymatique **(Résolution OIV/Oeno 313/2009).**
- Une autre monographie qui concerne les enzymes pectinolyase. Ces activités sont utilisées pour favoriser la macération du raisin, pour la clarification des moûts et des vins, pour améliorer la filtrabilité des moûts et des vins et le pressurage du raisin. Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées d'*Aspergillus*. Cette monographie précise l'objet, l'origine et le champ d'application ainsi que les critères de pureté et la méthode de détermination de l'activité enzymatique. **(Résolution OIV/Oeno 314/2009).**
- Une nouvelle monographie sur les bactéries lactiques qui vient remplacer dans le Codex œologique international, la monographie existante. Cette monographie précise toutes les prescriptions auxquelles doivent répondre les bactéries lactiques ainsi que certains milieux utilisés pour l'analyse et le contrôle. **(Résolution OIV/Oeno 328/2009)**
- Une nouvelle monographie sur les levures sèches actives qui vient remplacer dans le Codex œologique international, la monographie existante. Cette monographie précise toutes les prescriptions auxquelles doivent répondre les levures sèches actives ainsi que certains milieux utilisés pour l'analyse et le contrôle. **(Résolution OIV/Oeno 329/2009)**

- Une monographie relative à la détermination de la capacité d'une préparation enzymatique à couper les chaînes pectiques par la mesure de la viscosité. C'est une mesure purement technologique destinée à tester l'efficacité clarifiante réelle de l'enzyme. Elle rend compte essentiellement de l'activité "pectinase" qui ne peut pas être déduite directement de la libération de l'acide galacturonique dans le milieu. **(Résolution OIV/Oeno 351/2009)**.
- La modification de la monographie existante sur les tanins oenologiques par l'ajout d'une méthode de différenciation des tanins oenologiques commerciaux par une analyse CG/SM des monosaccharides et des polyols. La méthode décrite permet de différencier des tanins de différentes origines. La concentration de monosaccharides et de polyols dans des échantillons de tanin est ainsi déterminée par couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse (CG/SM) après leur dérivatisation préalable en triméthylsilyléthers **(Résolution OIV/Oeno 352/2009)**.
- Une modification de la monographie existante sur les préparations enzymatiques figurant dans le Codex œnologique international. Cette résolution précise toutes les prescriptions auxquelles doivent répondre toutes les préparations enzymatiques susceptibles d'être utilisées au cours des diverses opérations que l'on peut appliquer aux raisins et à leurs dérivés. **(Résolution OIV/Oeno 365/2009)**.
- Une nouvelle monographie qui concerne la carboxyméthylcellulose. Cette monographie précise toutes les prescriptions auxquelles doivent répondre la carboxyméthylcellulose en particulier son origine et les différentes limites. La carboxyméthylcellulose à usage œnologique est préparée uniquement à partir de bois par traitement avec de la soude et de l'acide monochloroacétique ou son sel de sodium. **(Résolution OIV/Oeno 366/2009)**
- Deux nouvelles monographies qui concernent le chitine-glucane **(Résolution OIV/Oeno 367/2009)** et le chitosane **(Résolution OIV/Oeno 368/2009)**. Le chitine-glucane d'origine fongique est un copolymère naturel, le constituant principal des parois cellulaires d'*Aspergillus niger*. Le chitosane, quant à lui, est un polysaccharide préparé à partir d'une origine fongique. Il est extrait et purifié à partir de sources fongiques alimentaires ou biotechnologique sûres et abondantes tels que *Agaricus bisporus* ou *Aspergillus niger*. Cette monographie précise également toutes les prescriptions auxquelles doivent répondre le chitine-glucane et le chitosane.

Décisions concernant les méthodes d'analyses

Enfin, les Etats-membres ont adopté lors de cette même session, de nouvelles méthodes d'analyse qui sont réunies dans le Recueil International des méthodes d'analyse des vins et des moûts de l'OIV, en particulier :

- La nouvelle classification des méthodes d'analyse des moûts et des vins de l'OIV. Les Etats-membres de l'OIV ont considéré la nécessité de classer certaines méthodes d'analyses selon les nouveaux critères de classification mentionnés dans la résolution 9/2000 et que les méthodes figurant dans le Recueil des méthodes d'analyse des vins et des moûts seront, si nécessaire, modifiées en conséquence. Par ailleurs, certaines méthodes d'analyse qui ne sont plus utilisées seront éliminées du Recueil international des moûts et des vins. **(Résolution OIV/Oeno 377/2009)**
- Des recommandations relatives à la correction du taux de recouvrement, qui doivent être inclus dans le recueil des méthodes d'analyse. L'OIV recommande certaines procédures en ce qui concerne les comptes-rendus relatifs au taux de recouvrement de résultats analytiques. **(Résolution OIV/Oeno 392/2009)**.
- La méthode pour la détermination du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) relargable par les bouchons mesure le TCA libéré par un échantillon de bouchons macéré dans une solution hydroalcoolique. L'objectif de cette méthode est d'évaluer le risque de libération par le lot de bouchons analysés et de fournir une méthode visant le contrôle de qualité des bouchons de liège. La méthode vise à simuler les phénomènes de migration du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) susceptibles de se produire

entre le bouchon de liège et le vin en bouteilles. Le TCA de l'espace de tête d'une partie aliquote du macérat est prélevé par la technique de microextraction en phase solide (SPME), puis analysé par chromatographie en phase gazeuse, avec détection par spectrométrie de masse (GC/MS) ou par capture d'électrons (GC/ECD). **(Résolution OIV/Oeno 296/2009)**

- La méthode du dosage du glutathion dans les moûts et les vins par électrophorèse capillaire. La séparation des solutés d'un mélange par électrophorèse capillaire est obtenue par migration différentielle dans un électrolyte. Cette méthode permet le dosage du glutathion dans les moûts et les vins dans une gamme de concentration de 0 à 40 mg/L. Elle utilise l'électrophorèse capillaire (EC) couplée à une détection fluorimétrique (LIF). **(Résolution OIV/Oeno 345/2009)**
- Une méthode d'analyse des amines biogènes des moûts et des vins par HPLC. Cette méthode de type II est applicable à l'analyse des amines biogènes dans les moûts et les vins. Dix-sept amines biogènes peuvent être séparées par cette méthode. Les amines biogènes sont directement dosées par HPLC à l'aide d'une colonne C₁₈ après dérivation à l'O-phthaldialdéhyde (OPA) et détectés par fluorimétrie. **(Résolution OIV/Oeno 346/2009)**
- La modification de l'actuelle méthode de type II de détermination du rapport isotopique ¹⁸O/¹⁶O de l'eau dans le vin visée à l'Annexe A du Recueil de Méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. La méthode permet la détermination du rapport isotopique ¹⁸O/¹⁶O de l'eau dans le vin et le moût après équilibrage avec du CO₂, par spectrométrie de masse isotopique (SMRI). La méthode est fondée sur l'équilibrage isotopique de l'eau dans des échantillons de vin ou de moût avec un gaz-type CO₂. Après équilibrage, le dioxyde de carbone dans la phase gazeuse est utilisé pour analyse par spectrométrie de masse isotopique (SMRI), où le rapport isotopique ¹⁸O/¹⁶O est déterminé sur le CO₂ résultant de l'équilibrage. **(Résolution OIV/Oeno 353/2009)**
- Un complément à la méthode « Extrait sec total » figurant dans le « Recueil des méthodes d'analyse des vins et des moûts en ajoutant une note relative au calcul de l'extrait sec total en prenant séparément en compte les quantités de glucose et fructose (sucres réducteurs) et la quantité de saccharose. **(Résolution OIV/Oeno 387/2009)**
- Une modification de la méthode d'analyse figurant actuellement dans le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV sur la recherche et le dosage des polychlorophénols et des polychloroanisoles, dans les vins, les bouchons, les bois et les bentonites utilisées comme pièges d'atmosphère. Le principe de cette méthode de type IV est basé sur le dosage du 2,4,6-trichloroanisole, du 2,4,6-trichlorophénol, du 2,3,4,6-tétrachloroanisole, du 2,3,4,6-tétrachlorophénol, du pentachloroanisole et du pentachlorophénol en chromatographie en phase gazeuse par injection d'un extrait à l'hexane du vin et à l'éther/hexane des échantillons solides à analyser et étalonnage interne. **(Résolution OIV/Oeno 374/2009)**
- La révision du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons. En effet, quatre résolutions concernant cette révision ont été adoptées en particulier compte tenu que certaines méthodes d'analyse ne sont plus utilisées et devraient être éliminées du Recueil, d'une part et de l'évolution des méthodes et de la disponibilité des paramètres de validation inter-laboratoire depuis 1994 d'autre part **(Résolutions OIV/Oeno 379/2009, OIV/Oeno 380/2009, OIV/Oeno 381/2009, OIV/Oeno 382A/2009)**. Ainsi ces décisions entraîneront la publication par l'OIV d'un nouveau « Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole ».

* * *



RÉSOLUTION OIV/COMEX 05/2009

MODIFICATION DE L'ALINEA 1 DE L'ARTICLE 4 DU CHAPITRE 1 DU REGLEMENT INTERIEUR

L'Assemblée Générale de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant que tout Etat souverain, selon qu'il souhaite assister, intervenir ou participer aux activités de l'OIV, dispose d'un droit d'option pour solliciter un statut d'Observateur ou un statut de Membre,

Considérant que cette option n'est pas possible pour les organisations internationales intergouvernementales composées d'Etats souverains et qui disposent de compétences transférées par ses Etats membres,

Considérant que les Etats membres de l'OIV, lors de la création de l'OIV ont spécifiquement souhaité que les organisations internationales intergouvernementales bénéficient d'une considération particulière en créant dans l'accord du 3 avril 2001 un Chapitre VI – « Participation des organisations internationales intergouvernementales »,

Considérant que ce Chapitre VI, est constitué d'un article 8 unique qui dispose « Une organisation internationale intergouvernementale peut participer aux travaux de l'O.I.V ou en être membre et contribuer au financement de l'Organisation dans des conditions qui seront fixées, au cas par cas, par l'Assemblée générale sur proposition du Comité exécutif. »

DECIDE de modifier l'alinéa 1 de l'article 4 du Chapitre 1 « La nature de l'Organisation, les conditions d'adhésion, les conditions de retrait » du Titre I « Dispositions générales » du Règlement Intérieur, afin de permettre aux organisations internationales intergouvernementales composée d'Etats souverains de disposer d'un droit d'option pour solliciter un statut particulier ou un statut de Membre.

Dans l'Article 4 alinéa un les mots « qui ne remplit pas la totalité des conditions définies à l'Article 2.2 alinéa (b) » sont supprimés.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/CONCOURS 332B/2009

LIGNES DIRECTRICES POUR L'OCTROI DU PATRONAGE DE L'OIV POUR CONCOURS DE VINS ET DE BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE

L'Assemblée Générale de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Adopte le document suivant et demande au secrétariat de le mettre en œuvre :

Lignes directrices pour l'octroi du patronage de l'OIV pour concours de vins et de boissons spiritueuses d'origine vitivinicole

En application de l'article 24.3 du Règlement intérieur, l'Organisation internationale de la vigne et du vin peut accorder son patronage à des concours internationaux ou nationaux de vins et boissons spiritueuses d'origine vitivinicole, à condition que les modalités d'organisation et le règlement propre à chacun d'eux soient conformes aux normes internationales de l'O.I.V.

Le présent document fixe les lignes directrices qui s'appliquent à l'octroi du patronage aux Concours internationaux (Titre I) et aux Concours nationaux (Titre II).

Titre I : Concours internationaux

1 OBJET :

Définition des conditions et de la procédure d'octroi du patronage de l'OIV pour les concours internationaux des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole conformément à l'article 24.3 du règlement intérieur.

Les concours internationaux peuvent être de deux types, soit généraux, c'est-à-dire ouverts à toutes les catégories prévues à la norme des concours internationaux, soit catégoriels, c'est-à-dire, limités à une ou plusieurs catégories de vin ou de boisson spiritueuse d'origine vitivinicole déterminées.

2 CONDITIONS D'ATTRIBUTION DU PATRONAGE :

2.1. Les organisateurs de concours internationaux respectent la norme de l'OIV pour les concours internationaux des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole et les présentes lignes directrices en vigueur au moment de la demande.

2.2. Le concours doit avoir une vocation internationale :

- la participation d'échantillons originaires d'au moins 8 pays pour les concours généraux, ou d'au moins 5 pays pour les concours catégoriels est exigée lors de l'édition précédente ; et
- le nombre des échantillons originaires de pays autres que le pays où se situe le siège de l'organisateur, doit être d'au moins 20% pour les concours généraux, ou d'au moins 15% pour les concours catégoriels, du nombre total des échantillons présentés lors de l'édition précédente.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

2.3. Le nombre total des échantillons présentés pour chaque concours doit être supérieur à 500 pour les concours généraux, ou à 300 pour les concours catégoriels, lors de l'édition précédente.

Toutefois, à titre dérogatoire, les concours internationaux qui bénéficient d'un agrément ou d'une tutelle d'un organisme public du pays organisateur peuvent être dispensés du respect des seuils visés au 2.2 et au 2.3 pour solliciter le patronage de l'OIV.

2.4. Une précédente édition du concours (sans patronage) doit avoir été organisée avec la participation d'un observateur désigné par l'OIV pour en examiner et en rapporter le déroulement. Cette observation préalable n'est pas requise pour un concours déjà patronné mis en place par le même organisateur sur un autre territoire. Un Concours international cédé à un nouvel organisateur perd le patronage de l'OIV et devra être soumis à observation pour pouvoir obtenir à nouveau ce patronage.

2.5. Les organisateurs de concours internationaux participent aux frais d'administration des patronages par le versement à l'OIV d'une contribution par échantillon dont le montant est fixé par le Comité Exécutif de l'OIV.

2.6. Néanmoins, pour les Concours qui sont membres de Fédération Mondiale des Grands Concours de Vins Vinofed qui bénéficie du statut d'observateur auprès de l'OIV, la demande de patronage est présentée directement par le secrétariat de Vinofed. En raison du versement d'une cotisation d'observateur par Vinofed, les concours qui en sont membres sont dispensés du versement de la contribution par échantillon pour autant que le statut d'observateur soit maintenu.

3 DOCUMENTATION A FOURNIR PAR L'ORGANISATEUR :

L'organisateur fournit, avec sa demande, toutes les pièces justificatives prévues dans le formulaire annexé ainsi que toute autre pièce qu'il juge utile dans une des langues officielles de l'OIV.

4 EXAMEN DE LA DEMANDE :

4.1 La demande de patronage est adressée au Directeur Général de l'O.I.V. avec les renseignements disponibles sur le formulaire correspondant au concours.

4.2 Le Directeur Général peut solliciter toute information complémentaire qu'il juge nécessaire à l'examen de la demande.

4.3 Lorsque le concours est organisé sur le territoire d'un membre et/ou par un ressortissant d'un membre, la demande avec la documentation fournie est transmise par le Directeur Général de l'O.I.V. au(x) délégué(s) de ce(s) membre(s) au Comité Exécutif pour avis.

4.4 Le Directeur Général transmet les documents fournis par l'organisateur, ainsi que le rapport de l'observateur désigné (en cas d'une précédente édition) ou de l'expert commissaire (pour les éditions ultérieures), aux membres du Comité Scientifique et Technique de l'O.I.V. pour avis et aux délégués au Comité Exécutif.

4.5 Pour être examinées par les prochains CST et COMEX de l'OIV, les demandes doivent être reçues par le Directeur Général au plus tard, soit le 31 janvier pour examen en mars, soit le 15 septembre pour examen en octobre, et en tout état de cause au moins quatre mois avant la réalisation du concours. Exceptionnellement, lorsque les organes de l'OIV sont dans l'impossibilité de statuer dans les délais prévus, le Directeur Général, quand les critères susvisés sont remplis, peut, après consultation écrite du ou des délégué(s) officiel(s) du ou des membres concerné(s) par le

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

concours, saisir, pour décision, les membres du Bureau. Le Directeur Général communique à l'ensemble des membres du Comité Exécutif cette décision du Bureau.

4.6 Le nom, l'acronyme ou le logo de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin ne doivent, en aucun cas, être utilisés dans les documents, informations ou communiqués faits à l'initiative de l'organisateur de concours internationaux. Leur utilisation est subordonnée à l'octroi du patronage. . Le fait de saisir l'O.I.V. n'autorise en aucun cas une utilisation préalable.

5 OCTROI DU PATRONAGE :

5.1 La décision d'accorder ou non le patronage de l'OIV est prise par le Comité Exécutif de l'O.I.V., après avis du Comité Scientifique et Technique de l'O.I.V., ou, dans les conditions particulières visées à l'article 4.5 ci-dessus, par le Bureau.

5.2 La décision est signifiée par le Directeur Général.

5.3 Cette décision est définitive et n'est pas susceptible d'appel.

5.4 Le patronage pour le concours international est accordé pour une édition.

6 BENEFICES ET OBLIGATIONS LIES A L'OCTROI DU PATRONAGE

6.1 L'accord donné par l'O.I.V. implique qu'il soit fait référence à ce patronage dans tous les documents d'informations liés au concours avec la mention « sous le patronage – ou le haut patronage de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin ». En aucun cas le sigle O.I.V. ne sera traduit ou modifié. Le logo devra être utilisé en liaison avec la référence à ce patronage.

6.2 L'accord donné par l'O.I.V. engage l'organisateur du concours à la prise en charge de l'expert commissaire désigné par l'OIV pour contrôler l'application des normes du concours. La prise en charge, dans des conditions analogues à celles des membres du Jury, comprend les frais de déplacement et d'hébergement de la personne désignée par l'OIV. Ces obligations s'appliquent également à l'observateur désigné par l'OIV pour une première demande de patronage.

6.3 L'accord donné par l'O.I.V. engage l'organisateur du concours à adresser à l'O.I.V. tous actes, et notamment le palmarès, qui seraient publiés à l'occasion de ce concours.

6.4 L'accord donné par l'O.I.V. engage l'organisateur du concours à verser à l'OIV la contribution prévue au point 2.5 des présentes lignes directrices.

Titre II : Concours nationaux (à rédiger)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

**DEMANDE DE PATRONAGE
FORMULAIRE OFFICIEL**

➤ Nom de l'organisateur :

.....
.....
.....
.....
.....

Demande le patronage de l'O.I.V. pour le Concours international de vins et/ou de boissons spiritueuses d'origine vitivinicole intitulé :

.....

Qui se déroulera conformément au formulaire joint.

Je m'engage à respecter la Norme O.I.V. des concours internationaux des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole et les lignes directrices pour l'octroi du patronage.

Fait à :

Le

Signature

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

**FORMULAIRE DE
DEMANDE DE PATRONAGE
CONCOURS INTERNATIONAUX DE VINS ET DE BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE
VITIVINICOLE**

➤ Titre du concours :

.....
.....

➤ Dates :

Lieu :

Pays :

.....

➤ Organisateur responsable :
(coordonnées complètes)

.....
.....
.....

Téléphone

Télécopie

E-mail

.....

➤ Règlement du Concours : (à joindre obligatoirement)

.....
.....
.....

➤ Liste des dégustateurs confirmés ou pressentis :

.....
.....
.....
.....
.....
.....

➤ Autres patronages demandés :

.....
.....
.....

➤ Support et modalités de diffusion du Palmarès et/ou des
actes envisagés:

.....
.....

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/CONCOURS 332A/2009

NORME OIV DES CONCOURS INTERNATIONAUX DES VINS ET BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

ayant pris connaissance des travaux du groupe ad hoc « Concours internationaux des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole »,

DECIDE:

de remplacer la norme OIV des concours internationaux des vins, adoptée en 1994, et la norme des concours internationaux de boissons spiritueuses d'origine vitivinicole, adoptée en 1999, par la norme suivante

NORME OIV DES CONCOURS INTERNATIONAUX DE VINS ET DE BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE

Article 1 : DEFINITION ET BUTS

Au sens de la présente norme on entend par Concours la compétition de vins ou de boissons spiritueuses d'origine vitivinicoles préalablement inscrits qui sont candidats pour obtenir une récompense sur la base de leur qualité qui est évaluée par un jury qualifié et qui se déroule dans le strict respect des dispositions de la présente norme.

Le concours international a pour but :

- de favoriser la connaissance des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole de bonne qualité,
- d'encourager leur production et leur consommation responsable en tant que facteur de civilisation,
- de faire connaître et présenter au public les types caractéristiques du vin et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole produits dans les divers pays,
- d'élever le niveau technique et scientifique des producteurs,
- de contribuer à l'expansion de leur culture,

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Article 2: CHAMP D'APPLICATION

2-1. Concours patronnés par l'OIV

Sans préjudice de règles plus restrictives, la présente norme s'applique aux concours qui sollicitent le patronage de l'OIV dont les conditions d'octroi sont définies par les lignes directrices prévues au Règlement intérieur de l'OIV.

Pour ces concours, l'O.I.V. désigne un expert commissaire pour l'ensemble du Concours. Il/elle assiste aux travaux des différents Jurys. Il/elle a pour mission de vérifier le respect des règles édictées par la présente Norme. L'Organisateur doit, préalablement ou simultanément au déroulement du concours, permettre au commissaire d'accéder à toutes informations utiles en mettant à sa disposition une personne techniquement compétente. Il/elle établit pour l'OIV un rapport circonstancié sur le déroulement du concours. Sur la base de ce rapport l'O.I.V. formule éventuellement des recommandations et peut retirer son agrément avant l'échéance prévue.

Seuls les concours patronnés par l'OIV sont autorisés à utiliser le nom, le sigle ou le logo de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin dans les conditions fixées dans les lignes directrices susvisées. Ils bénéficient d'une communication adaptée sur le site internet de l'OIV

2-2 : Autres concours

Les organisateurs d'autres concours qui utilisent tout ou partie de la présente norme ne peuvent en aucun cas faire référence à l'OIV.

L'OIV prendra toute mesure qu'elle jugera opportune pour prévenir un usage abusif de son nom, de son sigle ou de son logo.

Article 3 : PRODUITS ADMIS A CONCOURIR

Le concours est ouvert, sans discrimination, à tous les vins et boissons spiritueuses d'origine vitivinicole, conformément aux définitions du « code international des pratiques œnologiques » de l'O.I.V. Tous ces produits doivent porter l'indication du pays d'origine où ont été récoltés les raisins et élaborés les vins et les boissons spiritueuses d'origine vitivinicole. Tous ces produits doivent être détenus en vue de la vente et être issus d'un lot homogène d'au moins 1000 litres. A titre exceptionnel, un volume réduit, mais toutefois supérieur à 100 litres, peut être admis sur justification d'une production particulièrement faible. Tous les échantillons doivent être présentés avec l'étiquetage et la présentation commerciale. Si le produit a été conditionné spécifiquement pour le concours, il devra être accompagné de documents explicatifs justifiant cet état.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Article 4 : MODALITES D'INSCRIPTION

Le bulletin d'inscription de chaque échantillon devra obligatoirement comprendre:

- L'identification complète et exacte du participant qui doit être titulaire du droit de commercialiser ou de distribuer le lot correspondant à l'échantillon,
- La désignation exacte du produit, selon la réglementation du pays d'origine, la couleur en ce qui concerne les vins, si possible, le millésime ou une mention d'âge et la mise au contact éventuelle avec le bois,
- La catégorie du produit selon l'Annexe I (RANGEMENT DES ECHANTILLONS DANS LES DIFFERENTES CATEGORIES), les sous-groupes peuvent faire l'objet de divisions ou de regroupement, sous la responsabilité de l'organisateur,
- Le bulletin d'analyses, conformément à l'Annexe II, effectuées par un laboratoire agréé ou par un laboratoire compétent conformément au droit du pays ou certifiées par l'œnologue¹ responsable de la cave,
- Le ou les cépages et leur pourcentage dans le vin et, si nécessaire, dans les boissons spiritueuses d'origine vitivinicole,
- La quantité disponible correspondant à l'échantillon.

Article 5 : CONTROLE ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS RECUS

1. L'organisateur vérifie les échantillons reçus en relation avec le bulletin d'inscription et les documents officiels qui les accompagnent. Il porte son attention sur l'emploi correct des appellations d'origine ou des indications géographiques. Il refuse les échantillons ne répondant pas aux dispositions de la présente norme.

2. Il doit stocker les échantillons dans un local sécurisé et dans des conditions de températures et d'ambiance garantissant une bonne conservation.

¹ Définition internationale du titre et de la fonction d'œnologue (résolution 7/76)

A- Définition

L'œnologue est la personne qui, en raison de ses connaissances scientifiques et techniques consacrées par le diplôme correspondant, est capable de remplir, dans le respect des bonnes et loyales pratiques, les fonctions définies ci-après.

B- Fonctions de l'œnologue

L'œnologue a pour fonctions :

- a) d'appliquer rationnellement les renseignements reçus ou ceux puisés dans les mémoires scientifiques et techniques, et éventuellement de procéder à des recherches technologiques ;
- b) de collaborer à la conception du matériel utilisé en technologie et pour l'équipement des caves
- c) de collaborer à l'établissement et à la culture des vignobles
- d) de prendre la pleine responsabilité de l'élaboration des jus de raisins, des vins et des produits dérivés du raisin, et d'en assurer la bonne conservation

- e) de procéder aux analyses (physique, chimique, microbiologique et organoleptique) des produits ci-dessus et d'en interpréter les résultats
- f) d'être en mesure d'apprécier les relations existant entre l'économie et la législation viti-vinicoles et la technique œnologique, et d'organiser la distribution du produit

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Article 6 : CLASSIFICATION ET RANGEMENT DES ECHANTILLONS PRESENTES

Après contrôle, en se fondant sur le bulletin d'inscription et le bulletin d'analyses, sur l'exactitude des inscriptions dans chaque catégorie, les échantillons sont généralement présentés aux jurys, dans chaque catégorie, dans l'ordre des millésimes, en tenant compte toutefois de la teneur en sucres et, le cas échéant, en fonction de leur caractère boisé ou non boisé.

Article 7 : DESIGNATION DES JURES

1. L'organisateur, responsable du concours, désigne les jurés. Il peut demander à l'O.I.V. de lui suggérer des noms d'experts de différents pays.

2. L'appréciation des échantillons est faite par des jurys internationaux, dont le nombre est fixé en fonction du nombre et de la nature des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole présentés au concours.

3. Dans un jury, il convient de respecter une grande dispersion géographique des origines des jurés. Dans un même jury, les jurés, à la majorité absolue, ne doivent pas être ressortissants du pays organisateur. Il est souhaitable que l'un des jurés représente un pays surtout consommateur de vin.

4. Chaque jury se compose, en principe, de 7 jurés dont trois nationaux au maximum. En aucun cas, le nombre des jurés ne peut descendre en dessous de 5, dont deux nationaux au maximum.

Les jurés, qui ont tous des connaissances des techniques de dégustation, sont en majorité des œnologues ou des personnes en possession d'un diplôme équivalent dans le domaine du vin ou des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole. Des personnes ayant déjà démontré avoir une haute qualification pour la dégustation dans le domaine du vin et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole peuvent venir compléter le jury. L'organisateur doit veiller à disposer de données sans cesse mises à jour à leur sujet dans le but d'assurer leur évaluation constante.

5. Les jurys fonctionnent sous l'autorité d'un Président. Il peut être également prévu d'avoir un Président unique. Ce dernier est un œnologue ou une personne en possession d'un diplôme équivalent dans le domaine du vin ou des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole ; il peut être membre du jury. Il assure, en liaison avec l'organisateur, le fonctionnement général du jury, conformément à l'article 10.

6. Les jurés sont désignés "*intuitu personae*". Ils ne peuvent donc être remplacés que par l'autorité qui les a désignés. L'organisateur doit veiller à ce qu'un juré ne puisse pas participer dans un jury s'il a une relation commerciale avec l'échantillon présenté.

De même, un juré ne doit pas être invité à participer en fonction de sa contribution en termes d'échantillons mais bien sur base de ses compétences.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Article 8 : MISSION ET RESPONSABILITE DE L'ORGANISATEUR

L'organisateur du concours est seul responsable de la réalisation matérielle du concours et des risques inhérents. Il peut se faire assister dans ses fonctions par un juriste.

L'organisateur doit veiller au parfait déroulement des opérations de préparation, et d'examen des échantillons, et de communication des résultats, et d'évaluation constante des jurés, Notamment :

- veiller au secret concernant l'anonymat absolu des échantillons soumis aux jurés ainsi qu'au secret des résultats jusqu'à la clôture du concours,
- contrôler, avant l'installation du jury, l'organisation de la dégustation dont il a la responsabilité. Il vérifie notamment l'ordre dans lequel seront présentés les échantillons,
- contrôler l'ouverture des échantillons dans la salle annexe, leur température, leur identité et leur anonymat vis-à-vis des membres du jury ; de veiller aussi à la diligence du service,
- contrôler le fonctionnement du secrétariat chargé du dépouillement des résultats : distribution et ramassage des fiches, vérification de la conformité de l'identification de l'échantillon, calculs, affichage des résultats,
- prévoir une séance d'information préalable de tous les jurés sur l'utilisation correcte de la fiche de dégustation et de ses descripteurs, illustrée par un ou deux exemples pratiques.
- garantir que les commentaires de dégustation qui pourraient être diffusés sont le résultat de la dégustation réalisée à l'occasion du Concours
- permettre une deuxième dégustation d'un échantillon, notamment lorsque :
 - la majorité des jurés le demande,
 - et chaque fois que le Président d'un jury le juge utile en lui donnant exceptionnellement la possibilité de le faire déguster dans un autre jury.

Article 9 : FONCTIONNEMENT GENERAL DES JURYS

1. Discipline

L'anonymat absolu étant un principe fondamental d'un concours :

1.1 Les jurés sont tenus au silence et à l'absence de gestes ou de mimiques explicitant leurs impressions durant la dégustation et la cotation.

1.2 Avant le service des échantillons, une fiche récapitulative des échantillons présentés et les fiches de notation correspondantes ou le support informatique adéquat sont mis à la disposition des jurés. Elles peuvent déjà porter les indications techniques relatives aux échantillons. Les fiches de notation doivent, au moment de leur restitution, comporter le nom du juré ou son identification et dans tous les cas sa signature. Pour les concours informatisés, une liste récapitulative des échantillons avec la notation moyenne du jury doit être soumise au Président du jury chaque jour pour contrôle et signature.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

1.3 Le personnel ramassant les fiches s'assure qu'elles sont correctement remplies. Le président les signe pour les authentifier ou doit être mis en mesure de vérifier la saisie correcte des données en cas d'utilisation d'un support informatique.

1.4 Il n'est pas laissé de doubles de fiches de notation aux jurés.

1.5 A l'issue des séances journalières de dégustation, l'organisateur doit fournir aux jurés une liste récapitulative donnant l'origine géographique et si possible le ou les cépages au regard de chaque échantillon qu'il a dégusté.

2. Fonctionnement matériel

Une fois les jurys formés, afin d'éclairer les jurés sur l'exercice de leur mission, ils doivent être réunis pour une séance préalable d'explications et de dégustation en commun, avec comparaison des résultats de certains jurés. Une attention particulière sera apportée au mode d'emploi de la fiche de dégustation et à la signification des descripteurs.

2.1 Le ou les jurys siègent dans une salle isolée, calme, disposant d'une source d'éclairage suffisante ne déformant pas les couleurs, bien aérée et neutre de toute odeur, dont l'accès est en principe interdit à toute personne non indispensable à l'organisation de la dégustation. Sa température ambiante doit être maintenue dans toute la mesure du possible entre 20 et 24°C. Il est interdit d'y fumer. Par ailleurs, les jurés doivent éviter d'utiliser des parfums susceptibles de perturber le déroulement des séances. Il est obligatoire d'éteindre les téléphones portables.

2.2 Une seconde salle, contiguë mais hors de la vue des jurés, est réservée au débouchage et à la dissimulation de tout signe susceptible de permettre d'identifier l'échantillon. Il est également interdit d'y fumer. Une stricte discipline y sera maintenue et le silence de rigueur.

2.3 Dans tous les cas, les bouteilles sont placées auparavant dans un emballage dissimulant leurs formes et garantissant l'anonymat de l'échantillon. Toute marque d'identification doit être supprimée. Cet emballage doit garantir l'anonymat pendant la durée de la dégustation. Lorsqu'il est nécessaire, les bouchons originaux sont remplacés par un système de fermeture anonyme. Par ailleurs, les jurés ne doivent à aucun moment connaître l'identité des échantillons présentés. Le numéro de service qui apparaît sur l'emballage doit être différent du numéro d'inscription. L'expert commissaire de l'OIV s'assure de la manière dont est garanti l'anonymat de l'échantillon.

Après contrôle du numéro de service et accord du Président du jury, le remplissage des verres doit se faire dans la salle de dégustation devant chaque juré.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

2.4 Chaque juré reçoit un numéro d'ordre permanent. Il dispose d'un siège et d'une place portant son numéro et comportant une surface blanche avec :

- une carafe d'eau fraîche
- des morceaux de pain neutre
- des mouchoirs ou serviettes en papier
- un vase de déversement.

2.5 Chaque échantillon doit être présenté dans un verre adapté à sa catégorie, au moins du type international normalisé. (ISO 3591 :1977). Il est recommandé qu'il soit changé pour chaque échantillon.

2.6 La séance de dégustation a lieu de préférence le matin. Chaque juré ne peut en aucun cas déguster plus de 45 échantillons par jour, sans préjudice des éventuelles dégustations redemandées par le Président du Jury, à raison de trois séries de 15 échantillons de vins secs ou de deux séries de 15 échantillons de vins secs auxquelles on peut ajouter une série de 10 échantillons d'autres catégories. Pour les boissons spiritueuses d'origine vitivinicole, la dégustation se fait à raison de 30 échantillons maximum par jour, en 5 séances d'environ 6 échantillons chacune. En cas de dépassement de ces seuils et dans la limite de 50 échantillons par jour, une information précise doit être explicitement mentionnée dans le règlement du concours.

3. Présentation des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

Chaque produit est dégusté individuellement et non comparativement.

4. Pauses

Entre chaque série sera prévue une pause d'au minimum 15 minutes, au cours de laquelle l'organisateur veillera à ce que les jurés disposent de boissons et d'aliments qui ne risquent pas de perturber la suite de la dégustation.

Article 10 : ORDRE DE PRESENTATION DES ECHANTILLONS ET TEMPERATURE

1. Le but du rangement des vins et des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole est essentiellement de présenter aux jurys des séries homogènes successives d'échantillons en fonction des catégories et des critères suivants : provenance géographique, cépages², millésime, teneur en sucre, caractère boisé ou non boisé. Ces séries doivent être, de plus, examinées dans un ordre rationnel.

1.1 Les vins sont dégustés par les jurys et par séance, en principe dans l'ordre des catégories suivantes :

1. blancs effervescents
2. blancs tranquilles
3. rosés effervescents
4. rosés tranquilles

² L'OIV proposera une liste des cépages aromatiques.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

5. rouges effervescents
6. rouges tranquilles
7. vins sous voile
8. vins naturellement doux
9. vins de glace
10. vins de liqueur
11. mistelles.

1.2 Les boissons spiritueuses d'origine vitivinicole sont, en principe, dégustées dans l'ordre suivant :

1. eau-de-vie de vin
2. brandy / weinbrand
3. eau-de-vie de raisin
4. eau-de-vie de raisin sec
5. eau-de-vie de marc de raisin
6. eau-de-vie de lies de vin

2. L'organisateur assure la répartition des échantillons entre les jurys.

3. Avant chaque séance de dégustation, il est impératif de présenter aux jurés, dans des conditions analogues à la dégustation et en vue de leur "mise en bouche", un produit de préférence de même type que la série prévue. La dégustation et la cotation doivent être discutées en commun dans son jury.

4. Les plus grands efforts doivent être faits pour que les vins et les boissons spiritueuses d'origine vitivinicole soient dégustés par les jurés aux températures suivantes :

1. vins blancs et rosés : 10/12°C
2. vins rouges : 15/18°C
3. effervescents : 8/10°C
4. vins naturellement doux, vins de glace, vins de liqueur et mistelles : 10/14°C
5. boissons spiritueuses d'origine vitivinicole : 12/16 °C

En tout état de cause, il est indispensable que tous les produits d'un même type, dans une même séance, soient dégustés à la même température.

Article 11 : DESCRIPTION DE LA FICHE DE DEGUSTATION (voir Annexes 3.1, 3.2 et 3.3)

Chaque expert dispose de la fiche de dégustation correspondant à l'échantillon à déguster, et des définitions des descripteurs utilisés.

Ces fiches de dégustation sont rédigées dans des langues susceptibles d'être comprises par les jurés.

Un emplacement est réservé aux observations éventuelles concernant chaque caractère organoleptique.

Cette fiche doit comporter également le numéro du jury.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Le mode d'emploi de la fiche de dégustation qui décrit avec précision les caractères organoleptiques doit être communiqué aux jurés (Annexe 3.4.). Il est destiné à assurer une compréhension identique des termes utilisés par tous les jurés.

1. Fiche de dégustation vin :

Pour la dégustation des vins tranquilles, le modèle de fiche OIV-UIOE utilisé est conforme à celui qui figure ci-après (Annexe 3.1)*³.

Pour la dégustation des vins effervescents et pétillants, le modèle de fiche OIV-UIOE utilisé est conforme à celui qui figure ci-après (Annexe 3.2)*³.

2. Fiche de dégustation boissons spiritueuses d'origine vitivinicole :

Pour la dégustation des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole, le modèle de fiche OIV-UIOE utilisé est conforme à celui qui figure ci-après (Annexe 3.3)*³.

Pour des cas spécifiques le modèle de fiche peut être modifié en ce qui concerne la pondération des critères dans les 12 mois après l'entrée en vigueur de la norme.

Article 12 : ROLE DES JURES

Les jurés vérifient ou complètent, si nécessaire, les indications de la fiche relative à l'échantillon.

Après la dégustation de l'échantillon, chaque juré coche sur chaque ligne de la fiche la case correspondant à l'appréciation du caractère donné. En ce qui concerne la fiche O.I.V.-U.I.OE, chaque case correspond à un nombre de points, indiqué sur la fiche, permettant au juré de situer sa note.

Il note ses observations éventuelles dans l'espace réservé, signe la fiche et la rend ou valide son choix dans le cas d'un concours informatisé.

Article 13 : TRANSCRIPTION ET CALCUL DES RESULTATS

Le secrétariat vérifie que la fiche est complètement remplie et effectue ou contrôle le total de la note attribuée par le juré.

Lorsqu'un vin ou une boisson spiritueuse d'origine vitivinicole est noté « éliminé » pour défaut majeur, par au moins deux jurés, il ne peut, en aucun cas, obtenir une récompense dans ce jury.

Chaque échantillon reçoit une note qui est la moyenne des notes résultant du calcul de l'appréciation de chacun des jurés. Il est recommandé de procéder à l'élimination des notes qui diffèrent d'au moins sept points de la moyenne. Les jurés doivent être informés préalablement du choix de la méthode retenue.

*³ A titre transitoire et jusqu'au 31 décembre 2010, les fiches autorisées par les normes de 1994 (Vins) et 1999 (Boissons spiritueuses d'origine vitivinicole) sont admises.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Si le Président d'un jury le juge utile, il peut demander à la direction du concours une deuxième dégustation de l'échantillon par un autre jury. Dans le cas où la direction du concours accède à cette demande, seule la note de ce deuxième jury est prise en compte.

Article 14 : ATTRIBUTION DES RECOMPENSES

La somme de toutes les récompenses, attribuées aux échantillons ayant obtenu les meilleurs résultats, ne doit pas dépasser 30% du total des échantillons présentés au concours.

Les échantillons ayant obtenu à la dégustation un nombre de points déterminé, sont classés dans les niveaux de récompenses suivants :

- grand or – au moins 92 points
- or – au moins 85 points
- argent – au moins 82 points
- bronze – au moins 80 points.

Sous réserve d'une information préalable aux producteurs dans le règlement de chaque concours :

- le palmarès peut être réparti par groupe notamment pour les vins, par exemple en fonction de la teneur en sucre (par exemple plus de 45 g/L), de la teneur en CO₂, de la couleur, du millésime. Dans ce cas, la somme des récompenses attribuées dans chaque groupe ne peut pas dépasser 30% du total des échantillons présentés dans chaque groupe.
- Le palmarès peut être limité à un seul lauréat par groupe et pour chaque niveau de récompense. Dans ce cas, les lauréats, sont classés uniquement en fonction de leur rang.

Dans l'hypothèse d'un dépassement, les échantillons ayant obtenu les notes les plus basses ne sont pas pris en compte dans le palmarès.

La possibilité est laissée à l'organisateur de limiter le type de récompenses, et pour autant que l'échantillon ait obtenu au moins 80 points et dans la limite des 30% de récompenses, d'attribuer d'autres types de récompenses. Toujours dans la limite des 30% de récompenses, l'organisateur peut également prévoir des récompenses complémentaires notamment par pays, par cépage, par millésime, par type de vinification, par type d'élevage, etc. à condition que cela ne crée pas de confusion avec les récompenses énoncées au 1er alinéa.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Article 15 : MENTION DES RECOMPENSES

Les récompenses obtenues doivent obligatoirement être accompagnées d'une preuve documentaire, ou "Diplôme", établie par l'organisateur responsable du concours. Ce diplôme doit porter obligatoirement la désignation exacte de l'échantillon ayant obtenu la récompense et l'identification exacte du producteur ou du négociant en cause. Il ne devra en aucun cas être délivré d'autre certificat ou diplôme de participation. L'organisateur doit retirer toute distinction attribuée lorsqu'il est démontré que l'étiquetage n'est pas conforme au droit du pays d'origine ou qu'un usage indu a été fait ou qu'il a fait l'objet de manipulations frauduleuses.

Les récompenses obtenues peuvent être représentées sous forme de macaron, insigne de la récompense ou sous forme de contre-étiquette, dûment autorisés et quantifiés par l'organisateur permettant d'identifier un ensemble de données.

Si la récompense est matérialisée par une médaille, celle-ci devra obligatoirement porter l'indication de l'année du concours. Le nombre de médailles attribuées sera strictement limité à la quantité disponible déclarée lors de l'inscription au concours des vins ou des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

Afin d'assurer la traçabilité de l'attribution des récompenses, les organisateurs devront conserver pendant au moins un an toutes les pièces justificatives jointes à l'inscription des échantillons, les fiches de dégustation ainsi qu'un exemplaire des échantillons primés.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Annexe I

RANGEMENT DES ECHANTILLONS
DANS LES DIFFERENTES CATEGORIES

CATEGORIE I - VINS BLANCS DE CEPAGES NON AROMATIQUES		
	Groupe A - Vins tranquilles. (*) Ces vins peuvent présenter une surpression de gaz carbonique inférieure à 0,5 bars à 20°C.	
	Sous-groupe des vins contenant au plus 4 g/L de sucres	I-A-1
	Sous-groupe des vins contenant de 4,1 g/L à 12 g/L de sucres	I-A-2
	Sous-groupe des vins contenant de 12,1 g/L à 45 g/L de sucres	I-A-3
	Sous-groupe des vins contenant plus de 45 g/L de sucres	I-A-4
	Groupe B - Vins pétillants Ces vins présentent une surpression de gaz carbonique pouvant aller de 0,5 à 2,5 bars à 20°C.	
	Sous-groupe des vins contenant au plus 4 g/L de sucres	I-B-5
	Sous-groupe des vins contenant plus de 4 g/L de sucres	I-B-6
	Groupe C - Vins mousseux. Ces vins présentent une surpression de gaz carbonique supérieure à 2,5 bars à 20°C	
	Sous-groupe des vins mousseux contenant au plus 12 g/L de sucres avec une tolérance de +3 g/L	I-C-7
	Sous-groupe des vins mousseux contenant de 12,1 g/L à 32 g/L de sucres avec une tolérance de +3 g/L	I-C-8
	Sous-groupe des vins mousseux contenant de 32,1 g/L à 50 g/L de sucres	I-C-9
	Sous-groupe des vins mousseux contenant plus de 50 g/L de sucres	I-C-10
CATEGORIE II - VINS ROSÉS		
	Groupe A - Vins tranquilles. (*) Ces vins peuvent présenter une surpression de gaz carbonique inférieure à 0,5 bars à 20°C.	
	Sous-groupe des vins contenant au plus 4 g/L de sucres	II-A-11
	Sous-groupe des vins contenant de 4,1 g/L à 12 g/L de sucres	II-A-12
	Sous-groupe des vins contenant de 12,1 g/L à 45 g/L de sucres	II-A-13
	Sous-groupe des vins contenant plus de 45 g/L de sucres	II-A-14
	Groupe B - Vins pétillants Ces vins présentent une surpression de gaz carbonique pouvant aller de 0,5 à 2,5 bars à 20°C.	
	Sous-groupe des vins contenant au plus 4 g/L de sucres	II-B-15
	Sous-groupe des vins contenant plus de 4 g/L de sucres	II-B-16
	Groupe C - Vins mousseux. Ces vins présentent une surpression de gaz carbonique supérieure à 2,5 bars à 20°C	
	Sous-groupe des vins mousseux contenant au plus 12 g/L de sucres avec une tolérance de +3 g/L	II-C-17
	Sous-groupe des vins mousseux contenant de 12,1 g/L à 32 g/L de sucres avec une tolérance de +3 g/L	II-C-18
	Sous-groupe des vins mousseux contenant de 32,1 g/L à 50 g/L de sucres	II-C-19
	Sous-groupe des vins mousseux contenant plus de 50 g/L de sucres	II-C-20

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

CATEGORIE III - VINS ROUGES		
	Groupe A - Vins tranquilles. (*) Ces vins peuvent présenter une surpression de gaz carbonique inférieure à 0,5 bars à 20°C.	
	Sous-groupe des vins contenant au plus 4 g/L de sucres	III-A-21
	Sous-groupe des vins contenant plus de 4 g/L de sucres	III-A-22
	Groupe B - Vins pétillants Ces vins présentent une surpression de gaz carbonique pouvant aller de 0,5 à 2,5 bars à 20°C.	
	Sous-groupe des vins contenant au plus 4 g/L de sucres	III-B-23
	Sous-groupe des vins contenant plus de 4 g/L de sucres	III-B-24
	Groupe C - Vins mousseux. Ces vins présentent une surpression de gaz carbonique supérieure à 2,5 bars à 20°C	III-C-25

CATEGORIE IV - VINS DE CEPAGES AROMATIQUES		
	Groupe A - Vins tranquilles. (*) Ces vins peuvent présenter une surpression de gaz carbonique inférieure à 0,5 bars à 20°C.	
	Sous-groupe des vins contenant au plus 4 g/L de sucres	IV-A-26
	Sous-groupe des vins contenant de 4,1 g/L à 12 g/L de sucres	IV-A-27
	Sous-groupe des vins contenant de 12,1 g/L à 45 g/L de sucres	IV-A-28
	Sous-groupe des vins contenant plus de 45 g/L de sucres	IV-A-29
	Groupe B - Vins pétillants Ces vins présentent une surpression de gaz carbonique pouvant aller de 0,5 à 2,5 bars à 20°C.	
	Sous-groupe des vins contenant au plus 4 g/L de sucres	IV-B-30
	Sous-groupe des vins contenant plus de 4 g/L de sucres	IV-B-31
	Groupe C - Vins mousseux. Ces vins présentent une surpression de gaz carbonique supérieure à 2,5 bars à 20°C	
	Sous-groupe des vins mousseux contenant au plus 12 g/L de sucres avec une tolérance de +3 g/L	IV-C-32
	Sous-groupe des vins mousseux contenant de 12,1 g/L à 32 g/L de sucres avec une tolérance de +3 g/L	IV-C-33
	Sous-groupe des vins mousseux contenant de 32,1 g/L à 50 g/L de sucres	IV-C-34
	Sous-groupe des vins mousseux contenant plus de 50 g/L de sucres	IV-C-35

CATEGORIE V - VINS SOUS VOILE		
	Groupe A - vins contenant au plus 4 g/L de sucres	
	Sous-groupe des vins présentant un titre alcoométrique au plus égal à 15%	V-A-36
	Sous-groupe des vins présentant un titre alcoométrique supérieur à 15%	V-A-37
	Groupe B - vins contenant de 4,1 à 20 g/L de sucres	
	Sous-groupe des vins présentant un titre alcoométrique au plus égal à 15%	V-B-38
	Sous-groupe des vins présentant un titre alcoométrique supérieur à 15%	V-B-39
	Groupe C - vins contenant plus de 20 g/L de sucres	
	Sous-groupe des vins présentant un titre alcoométrique au plus égal à 15%	V-C-40
	Sous-groupe des vins présentant un titre alcoométrique supérieur à 15%	V-C-41

CATEGORIE VI - VINS NATURELLEMENT DOUX (Ex : vendanges tardives, vins botrytisés, vins de glace...)		
	Groupe A - Cépages non aromatiques	VI-A-42
	Groupe B – Cépages aromatiques	VI-B-43

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

CATEGORIE VII - VINS DE LIQUEUR		
	Groupe A - Cépages non aromatiques (Ex: Porto, Marsala, Madère, Mistelles, Tokay Aszu....)	
	Sous-groupe des vins de liqueur contenant au plus 6 g/L de sucres	VII-A-44
	Sous-groupe des vins de liqueur contenant de 6,1 à 40 g/L de sucres	
	et présentant un titre alcoométrique au plus égal à 18%	VII-A-45
	et présentant un titre alcoométrique supérieur à 18%	VII-A-46
	Sous-groupe des vins de liqueur contenant de 40,1 à 80 g/L de sucres	
	et présentant un titre alcoométrique au plus égal à 18%	VII-A-47
	et présentant un titre alcoométrique supérieur à 18%	VII-A-48
	Sous-groupe des vins de liqueur contenant plus de 80 g/L de sucres	
	et présentant un titre alcoométrique au plus égal à 18%	VII-A-49
	et présentant un titre alcoométrique supérieur à 18%	VII-A-50
	Groupe B – Cépages aromatiques (Ex. Muscats...)	VII-B-51
	Groupe C – Vins de liqueur sous voile (Ex. Jerez, Fino, Montilla-Morilles...)	VII-C-52

CATEGORIE VIII - MISTELLES		
		VIII-A-53

CATEGORIE IX – BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE		
	Groupe A - eau-de-vie de vin	IX-A-54
	Groupe B – Brandy/Weinbrand	IX-B-55
	Groupe C - eau-de-vie de raisin	IX-C-56
	Groupe D - eau-de-vie de raisin sec	IX-D-57
	Groupe E - eau-de-vie de marc de raisin	IX-E-58
	Groupe F - eau-de-vie de lies de vin	IX-F-59

(*) DÉROGATION

Les vins qu'il est d'usage de présenter avec une surpression de gaz carbonique supérieure à 0,5 bar et non supérieure à 1 bar pourront être classés dans le Groupe A - Vins tranquilles, à condition qu'ils soient mis à la dégustation à la suite des autres vins tranquilles.

REMARQUE : Si, dans un sous-groupe, il n'y a que quelques échantillons, on peut rattacher ces échantillons à un sous-groupe voisin.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Annexe II

BULLETIN D'ANALYSES DES VINS

Les échantillons doivent être accompagnés d'un bulletin d'analyses effectuées par un laboratoire agréé ou par un laboratoire compétent conformément au droit du pays ou certifiées par l'œnologue responsable de la cave et comportant au minimum les déterminations ci-dessous :

1. Titre alcoométrique volumique à 20 degrés C..... % vol.
2. Sucres (glucose + fructose) g/L
3. Acidité totale méq./L
4. Acidité volatile méq./L
5. Dioxyde de soufre (SO₂) total mg/L
6. Dioxyde de soufre (SO₂) libre mg/L
7. en ce qui concerne les vins mousseux et pétillants :
Suppression dans la bouteille..... (bars)
..... hPa

Les méthodes d'analyse employées sont celles qui figurent dans le Recueil des méthodes internationales d'Analyse des Vins et des Moûts.

BULLETIN D'ANALYSES DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE

Les échantillons doivent être accompagnés d'un bulletin d'analyses effectuées par un laboratoire agréé ou par un laboratoire compétent conformément au droit du pays ou certifiées par l'œnologue responsable de la cave et comportant au minimum les déterminations ci-dessous :

1. Titre alcoométrique volumique à 20 degrés C..... % vol.
2. Sucres g/L
3. Teneur en substances volatiles g/HL d'alcool à 100% vol.
4. Teneur en méthanol..... g/HL d'alcool à 100% vol.

Les méthodes d'analyse employées sont celles qui figurent dans le Recueil des méthodes internationales d'Analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Annexe 3.1



FICHE DE DEGUSTATION	VINS TRANQUILLES
----------------------	------------------



Jury	N°	Echantillon	N°	Catégorie	N°
------	----	-------------	----	-----------	----

		Excellent + —————→ - Insuffisant					Observations
Vue	Limpidité	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	<input type="checkbox"/> (1)	
	Aspect hors limpidité	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (2)	
Odorat	Franchise	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Intensité positive	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Qualité	<input type="checkbox"/> (16)	<input type="checkbox"/> (14)	<input type="checkbox"/> (12)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	
Goût	Franchise	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Intensité positive	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Persistance harmonieuse	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	
	Qualité	<input type="checkbox"/> (22)	<input type="checkbox"/> (19)	<input type="checkbox"/> (16)	<input type="checkbox"/> (13)	<input type="checkbox"/> (10)	
Harmonie - Jugement global		<input type="checkbox"/> (11)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (9)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	

Total	+	+	+	+	=
-------	---	---	---	---	---

Éliminé pour défaut majeur			0
----------------------------	--	--	---

Signature du juré

Signature du Président du Jury

Annexe 3.2



FICHE DE DEGUSTATION	VINS MOUSSEUX ET PETILLANTS
----------------------	-----------------------------



Jury	N°	Echantillon	N°	Catégorie	N°
------	----	-------------	----	-----------	----

		Excellent +					Insuffisant -	Observations
Vue	Limpidité	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	<input type="checkbox"/> (1)		
	Aspect hors limpidité	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (2)		
	Effervescence	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (2)		
Odorat	Franchise	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)		
	Intensité positive	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)		
	Qualité	<input type="checkbox"/> (14)	<input type="checkbox"/> (12)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (6)		
Goût	Franchise	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)		
	Intensité positive	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)		
	Persistance harmonieuse	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)		
	Qualité	<input type="checkbox"/> (14)	<input type="checkbox"/> (12)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (6)		
Harmonie - Jugement global		<input type="checkbox"/> (12)	<input type="checkbox"/> (11)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (9)	<input type="checkbox"/> (8)		

Total	+	+	+	+	=
-------	---	---	---	---	---

Éliminé pour défaut majeur					0
----------------------------	--	--	--	--	---

Signature du juré

Signature du Président du Jury

Annexe 3.3



FICHE DE DEGUSTATION	BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE
----------------------	--

Jury	N°	Echantillon	N°	Catégorie	N°
------	----	-------------	----	-----------	----

		Excellent + —————> — Insuffisant -					Observations
Vue	Limpidité	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	<input type="checkbox"/> (1)	
	Couleur	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	<input type="checkbox"/> (1)	
Odorat	Typicité	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (2)	
	Qualité	<input type="checkbox"/> (15)	<input type="checkbox"/> (13)	<input type="checkbox"/> (11)	<input type="checkbox"/> (9)	<input type="checkbox"/> (7)	
	Intensité positive	<input type="checkbox"/> (9)	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (3)	<input type="checkbox"/> (1)	
Goût	Typicité	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (7)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (5)	<input type="checkbox"/> (4)	
	Qualité	<input type="checkbox"/> (20)	<input type="checkbox"/> (18)	<input type="checkbox"/> (14)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (6)	
	Persistance harmonieuse	<input type="checkbox"/> (12)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (8)	<input type="checkbox"/> (6)	<input type="checkbox"/> (4)	
Harmonie - Jugement global		<input type="checkbox"/> (20)	<input type="checkbox"/> (18)	<input type="checkbox"/> (14)	<input type="checkbox"/> (10)	<input type="checkbox"/> (6)	

Total	+	+	+	+	=	
-------	---	---	---	---	---	--

Éliminé pour défaut majeur						0
----------------------------	--	--	--	--	--	---

Signature du juré

Signature du Président du Jury

Annexe 3.4

1. VUE / oeil

Discrimination de différences dans le monde extérieur par des impressions sensorielles dues aux rayonnements visibles

2. ODORAT / nez

Sensations perçues par l'organe olfactif lorsqu'il est stimulé par certaines substances volatiles

3. GOUT / bouche

Ensemble des sensations perçues lors de la prise du produit en bouche.

Limpidité

Définition : Mesure de l'état du trouble.

Ce descripteur permet de mesurer l'intensité du niveau de trouble d'un produit

LIMPIDITE	NOTE FICHE		
	VT	VM	BS
Excellente limpidité	5	5	5
Limpide	4	4	4
Doute sur la limpidité	3	3	3
Trouble modéré	2	2	2
Fort trouble	1	1	1

Aspect :

Définition : détermine l'ensemble des propriétés visible d'un produit

Ce descripteur évalue l'intensité, la couleur maîtresse du produit, ses nuances (couleurs secondaires), sa viscosité...sans tenir compte de sa limpidité.

ASPECT HORS LIMPIDITE	NOTE FICHE		
	VT	VM	BS
Excellente impression	10	10	5
Très bonne impression	8	8	4
Bonne impression	6	6	3
Assez bonne impression	4	4	2
Mauvaise impression	2	2	1

Intensité positive

Définition : degré (magnitude) de l'ensemble des odeurs qualitatives perçues par l'odorat et le goût.

Ce descripteur permet d'évaluer l'influence de l'ensemble des perceptions olfactives et gustatives qui contribuent à enrichir la perception qualitative perçues par les sens de l'odorat et du goût.

INTENSITE POSITIVE	NOTE FICHE		
	VT	VM	BS
Très forte intensité qualitative	8	7	9
Forte intensité	7	6	7
Moyenne intensité	6	5	5
Faible intensité	4	4	3
Très faible intensité	2	3	1

Franchise :

Définition : mesure du degré de la sensation perçue (magnitude) à l'odorat et au goût, d'un défaut de type viticole, œnologique ou étranger au produit.

Ce descripteur permet de juger de la franchise ou de la propreté d'un vin. En pénalisant la franchise le dégustateur devrait pouvoir identifier le ou les défauts d'origine viticole, œnologique ou étranger au vin, qu'il perçoit à l'odorat et au goût.

Les notes végétales, animales (etc), propres au cépage, de même que l'intensité des notes boisées sont évaluées sous la rubrique de la qualité.

Origines des défauts :

Matière première : raisins : pourris, grêlés, dégradés...

Contaminations : solvants volatils, phénols volatils, plastic, papier, TCA-moisi-, poussière, influence négatives des contenants (cuves en béton, acier, polyester, plastique, foudres en bois, barriques)

Microbien : phénols volatils (écurie, gouache, encre), acidité volatile, esters de l'acidité volatile, acétone

Oxydo-réduction : SO₂, tous les thiols et sulfures (caoutchouc, choux, œufs pourris, alliacé, sueur, lies, bière, savon, croupi) les manques de propreté, l'éthanal, l'oxydation.

FRANCHISE	NOTE FICHE		
	VT	VM	BS
Absence totale de défauts	6	7	
Très faible intensité de défauts	5	6	
Faible intensité de défauts	4	5	
Moyenne intensité de défauts	3	4	
Forte intensité de défauts	2	3	

Qualité :

Définition : ensemble des propriétés et caractéristiques d'un vin qui lui donne l'aptitude à satisfaire, l'odorat et au goût, des besoins exprimés ou implicites.

Ce descripteur permet de juger globalement le produit sur les plans olfactifs & gustatifs. Il accorde au dégustateur d'exprimer concrètement ses préférences personnelles et ses références culturelles.

A l'odorat, ce descripteur prend en compte **en priorité la complexité**, qui correspond à la richesse de la palette aromatique par la perception de plusieurs odeurs différentes et changeantes, associées à la **finesse** des odeurs.

QUALITE ODORAT	NOTE FICHE		
	VT	VM	BS
Excellente impression de qualité	16	14	15
Très bonne impression de qualité	14	12	13
Bonne impression de qualité	12	10	11
Assez bonne impression de qualité	10	8	9
Mauvaise impression de qualité	8	6	7

Au goût, ce descripteur prend en compte, **en priorité la richesse**, qui traduit la sensation globale que l'on a en bouche en intégrant les arômes (complexité), la structure (acide, tanins, alcool), les éléments d'enrobage (gras), les sucres résiduels, l'amertume.

QUALITE GOUT	NOTE FICHE		
	VT	VM	BS
Excellente impression de qualité	22	14	20
Très bonne impression de qualité	19	12	18
Bonne impression de qualité	16	10	14
Assez bonne impression de qualité	13	9	10
Mauvaise impression de qualité	10	8	6

Persistence :

Définition : Mesure de la durée de la sensation rémanente olfacto-gustative, correspondant à celle qui était perçue lorsque le produit était dans la bouche et dont la durée peut être mesurée dans le temps.

Ce descripteur équivaut à une mesure dans le temps. Il se calcule en seconde (caudalie) commence dès que le produit a quitté la bouche.

Le comptage se fait en mâchant et en ouvrant discrètement les lèvres en exerçant une petite dépression dans la bouche pour laisser entrer de l'air. Une mastication lente correspond à une seconde environ.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

PERSISTANCE HARMONIEUSE	NOTE FICHE		
	VT	VM	BS
Excellente persistance : > 6"	8	7	12
Très bonne persistance : 5" à 6"	7	6	10
Bonne persistance : 3" à 4"	6	5	8
Assez bonne persistance : 2"	5	4	6
Mauvaise persistance: 1"	4	3	4

TYPICITE GOUT	NOTE FICHE		
			BS
Excellente			8
Très bonne			7
Bonne			6
Suffisante			5
Insuffisante			4

Impression générale ou jugement global :

Définition : correspond à l'appréciation globale du produit.

Ce descripteur permet au dégustateur d'exprimer qu'elle impression le produit lui laisse dans son ensemble. Elle lui donne en particulier la possibilité de conforter sa note vers le haut ou vers le bas. Selon le type de concours et en fonction des informations fournies aux dégustateurs ce descripteur permet également d'aborder la notion difficile de typicité et l'appréciation du potentiel que possède le vin d'évoluer dans le temps.

IMPRESSION GENERALE	NOTE FICHE		
	VT	VM	BS
Excellente impression générale	11	12	20
Très bonne impression générale	10	11	18
Bonne impression générale	0	10	14
Impression générale suffisante	8	9	10
Impression générale insuffisante	7	8	6

Effervescence :

Définition : bouillonnement que provoque un gaz en se dégageant d'un liquide

En termes d'évaluation de l'effervescence, tant à la vue qu'au goût, on peut considérer trois descripteurs concernant les bulles :

- Finesse des bulles (= dimensions des bulles)
- Abondance des bulles (= quantité de bulles)
- Persistance des bulles (= durée pendant laquelle les bulles sont perçues)

Des bulles fines, pas trop impétueuses, régulières et persistantes sont évaluées positivement.

A l'inverse, des bulles grossières, agressives, irrégulières et peu persistantes sont évaluées négativement.

Pour l'appréciation visuelle, on doit rajouter l'évaluation du cordon (ou collerette), c'est-à-dire la mousse qui se forme à la surface du vin. Une évaluation positive est un cordon composé de 3-4 hauteurs de bulles, les bulles doivent être fines, petites, et le cordon doit persister longtemps.

EFFERVESCENCE	NOTE FICHE		
		VM	
Excellente		10	
Très bonne		8	
Bonne		6	
Suffisante		4	
Insuffisante		2	

Typicité :

Ce descripteur permet de juger si le produit en cause correspond aux caractères typiques de la catégorie de boisson spiritueuse d'origine vitivinicole

TYPICITE ODORAT	NOTE FICHE		
			BS
Excellente			6
Très bonne			5
Bonne			4
Suffisante			3
Insuffisante			2

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/VITI 355/2009

PROTOCOLE OIV D'ÉVALUATION DES VIGNES OBTENUES PAR TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

Sur proposition de la Commission I Viticulture,

AYANT PRIS ACTE des travaux développés par le groupe d'experts « RESSOURCES GÉNÉTIQUES ET SELECTION DE LA VIGNE » (GENET), visant à harmoniser les systèmes d'évaluation pour les nouvelles obtentions des vignes par des techniques de transformation génétique,

CONSIDÉRANT les recommandations de la Résolution Viti 1/2006 sur le « Génome de la vigne et des variétés génétiquement modifiées », en particulier la recommandation « que, par rapport à la variété/clone initial, tout changement de caractéristique dû à une modification génétique soit clairement décrit (à travers des études transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques, en plus de toute nouvelle méthode appropriée qui serait développée) »,

DECIDE d'adopter les lignes directrices du « Protocole OIV d'évaluation des vignes obtenues par transformation génétique »,

RECOMMANDE aux États membres d'adopter et d'intégrer les lignes directrices contenues dans le « Protocole de l'OIV pour l'évaluation des vignes obtenues par transformation génétique », le cas échéant, et conformément à son régime réglementaire.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

PROTOCOLE OIV POUR L'ÉVALUATION DES VIGNES OBTENUES PAR TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE

A. PRÉAMBULE

Des travaux de recherche, menés dans plusieurs pays, visant à améliorer les variétés de vignes existantes par des approches transgéniques sont en train de produire des vignes génétiquement modifiées (« vignes GM »).

Les modifications génétiques appliquées peuvent avoir différents objectifs, par exemple:

- amélioration de la résistance contre les maladies et les ravageurs, comme les maladies fongiques de la baie, du feuillage et du bois (ex. : mildiou, oidium, eutypiose, esca), les virus et leurs vecteurs (en particulier les nématodes), les bactéries, les phytoplasmes et les insectes (ex. : eudémis)
- tolérance aux stress abiotiques, notamment le stress thermique, la sécheresse, la salinité du sol et le gel
- tolérance à certains facteurs de production (herbicides)
- modification des caractéristiques physiologiques et phénologiques (apyrénie, véraison précoce) et des caractères qualitatifs (composition des produits, composants de la baie et leurs relations)

Des finalités scientifiques non appliquées peuvent exister.

B - BASES ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE L'ÉVALUATION

Outre les critères habituellement pris en considération pour la sélection des nouvelles variétés, le développement et l'exploitation de vignes GM ou des produits en découlant supposent la nécessité d'identifier et d'évaluer les risques et les avantages.

Pour évaluer les risques et avantages potentiels de la culture d'une vigne GM, les aspects suivants doivent être pris en compte :

- les caractéristiques de la modification génétique
- le gène chimère (gène cible, gène marqueur)
- l'espèce, la variété et le clone de la vigne, objets des transformations
- les conditions de croissance et l'écosystème
- l'application, à des fins alimentaires ou industrielles

Sur la base de ces facteurs, les vignes GM doivent être évaluées selon les critères suivants :

- effets sanitaires pour les consommateurs (ex. : potentiel toxique et allergénique),
- effets sur la composition du raisin
- effets sur l'environnement
- valeur commerciale potentielle

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Les aspects socio-économiques pourraient être pris également en considération.

Enfin, la procédure d'évaluation devrait précisément identifier les risques et les avantages potentiels de la vigne GM.

Toutes les procédures d'évaluation devraient reposer sur des hypothèses scientifiquement fondées. Les connaissances scientifiques issues d'autres cultures génétiquement modifiées devraient également être prises en compte. Il convient de noter que le protocole d'évaluation des vignes GM doit être flexible. Ainsi, par exemple, selon les caractéristiques modifiées (ex.: les caractères qualitatifs, de résistance ou phénologiques), les priorités des procédures d'évaluation devraient être établis **au cas par cas**.

Malgré l'autofécondation préférentielle des fleurs hermaphrodites de la vigne, la pollinisation de vignes non GM par le pollen de vignes GM situées à proximité n'est pas à exclure. Dans le genre *Vitis* le risque de diffusion incontrôlée des gènes incorporés dans d'autres variétés est très faible, du fait de la propagation commerciale asexuée des variétés et des clones. Cependant, le risque possible de l'introgression du (des) gène(s) incorporé(s) dans des populations sauvages du genre *Vitis* dépend du continent et de la région géographique. Il est inexistant dans les zones viticoles qui n'ont pas de vignes sauvages, comme l'Australie, l'Amérique du sud et la majeure partie de l'Afrique. Il est très limité en Europe, où la seule vigne sauvage – *Vitis vinifera subsp. sylvestris* – demeure rare et où les habitats sont généralement situés loin des zones viticoles commerciales.

C – CADRES GÉNÉRAUX POUR L'ÉVALUATION DE VIGNES TRANSGÉNIQUES

1. Institution de contrôle de la procédure d'évaluation

Chaque pays désigne une institution de contrôle responsable pour superviser les différentes procédures d'évaluation décrites conformément aux points 2.1-2.6 et qui agit dans le respect des critères établis dans son propre Pays. Cette institution de contrôle peut consister, par exemple, en un centre de recherche associé, un institut technique, une université, notamment qualifiés à mener des études et des enquêtes sur le génome. L'institution de contrôle peut nommer d'autres organisations et/ou laboratoires qualifiés pour exécuter certaines tâches secondaires spécifiques. L'institution de contrôle vérifie régulièrement les essais menés sur le terrain, collecte toutes les données pertinentes et évalue les résultats de toutes les expériences, qu'elle décrit dans des rapports annuels et synthétise dans un rapport final.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

2. Procédures d'évaluation

Pour chaque nouvelle obtention de vigne GM, les laboratoires qui ont effectué les travaux, ainsi que tous les processus de multiplication *in vitro*, les étapes d'acclimatation et les interventions de propagation et multiplication devraient être notifiés et documentés dans un registre et conformément aux recommandations de la résolution VITI 1/2006.

2.1 Évaluation phénotypique

a) Exigences relatives aux essais sur le terrain

La conception des essais sur le terrain peut varier en fonction de l'usage de la vigne GM (vin, raisin de table, raisin sec, porte-greffe) et du ou des caractère(s) modifié(s). Dans tous les cas, ces essais doivent être conduits de manière à produire des résultats fiables. Au minimum, ces essais sur le terrain doivent être menés sur des périodes et des sites bien distincts (des régions climatiques différentes), avec un nombre de plants et de répétitions conforme à l'analyse sur au moins trois périodes de récolte. De plus, la variété/clone original non transformé devrait être utilisé comme contrôle.

Au cours de la période d'essais des vignes génétiquement modifiées, les conditions établies (par exemple, les instructions concernant la manipulation des outils de taille, la défoliation, la cueillette) devraient être satisfaites.

b) Évaluation de la ou des caractéristique(s) cible(s)

D'après les essais sur le terrain et toutes autres données éventuellement disponibles, l'influence de la modification sur la ou les caractéristique(s) cible(s) devrait être précisément décrite. (ex. : modifications du niveau de résistance contre les maladies et les ravageurs, modifications de la teneur en sucre ou en acide, modifications qualitatives et/ou quantitatives des anthocyanes ou composés d'arôme, etc.). La description devrait se faire à travers des études transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques, en plus de toute nouvelle méthode appropriée qui serait développée. Dans tous les cas, des évaluations analytiques du produit final (vin, raisin de table, raisin sec) devraient être effectuées et complétées par des tests organoleptiques.

Dans les cas de porte-greffes, il faudrait aussi vérifier la compatibilité avec les greffons.

c) Évaluation d'autres caractéristiques en sus de la ou des caractéristique(s) cible(s)

Il convient de vérifier si, mis à part la ou les caractéristique(s) cible(s), d'autres caractéristiques viticoles importantes sont influencées par la modification génétique. Si tel est le cas, ces caractéristiques, ainsi que le degré des altérations par comparaison avec la variété/clone original non transformé, devraient être décrites en détail.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Les caractéristiques ampélographiques et ampélogométriques des vignes GM devraient être évaluées et comparées avec les données appropriées issues des la variété/clone original non transformé. Pour ce faire, il convient d'employer des méthodes et/ou des descripteurs scientifiquement approprié(e)s et internationalement accepté(e)s (OIV, UPOV). Toute altération importante devrait être signalée.

d) Stabilité du phénotype

La stabilité du gène transformé devrait être constatée sur plusieurs cycles de propagation par propagation asexuée. Il devrait être confirmé que les plantes adultes, après des multiplications répétées, ne montrent aucune autre altération importante et significative que celle(s) recherchée(s) et identifiée(s) dans les tests préliminaires.

2.2. Évaluation génotypique

La transformation génétique en soi devrait être confirmée par des techniques moléculaires appropriées (ex : PCR, séquençage, ...). En outre, le nombre de copies et le nombre de sites d'insertion devraient être analysés (ex. : Southern Blot). Pour les études sur la traçabilité (voir le point 2.3.), il convient de déterminer les outils moléculaires appropriés (ex. : marqueurs SCAR).

2.3. – Traçabilité de la modification génétique du produit final

Il convient de vérifier si le(s) gène(s) chimère(s), des parties du ou des gène(s) chimère(s), les nouveaux métabolites dus au(x) gène(s) incorporé(s) peuvent être tracé(s) dans le produit final (ex. : vin, raisin de table, raisin sec, huile de pépins). Ces données revêtent une grande importance au regard de l'étiquetage en cas d'usage commercial successif d'une vigne génétiquement modifiée. Dans certains cas, il peut être spécialement intéressant de s'assurer, pendant le processus de production, si les gènes incorporés ou les métabolites correspondants sont traçables (ex. : production vinicole : raisin frais -> moût -> pendant la fermentation -> plusieurs étapes après la fermentation jusqu'à la mise en bouteille). Cela devrait s'effectuer en employant des outils analytiques qu'il faut opportunément enregistrer et rendre disponibles pour l'Institution de contrôle.

2.4. Évaluation des possibles interactions des vignes transgéniques avec l'écosystème

En fonction du type de modification (au cas par cas), les résultats fiables des études de surveillance de l'influence de l'écosystème devraient être présentés (par exemple, l'éventuelle occurrence d'un transfert horizontal et/ou vertical de gènes, les effets sur la flore et/ou la faune, les changements qualitatifs et/ou quantitatifs du métabolisme et leurs effets possibles). Les méthodes d'évaluation de ces paramètres devraient reposer sur des protocoles scientifiques internationalement acceptés.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

2.5. – Évaluation des effets possibles des vignes transgéniques sur la santé des consommateurs

Si la transformation génétique induit des changements qualitatifs et/ou quantitatifs des métabolites du produit final, l'influence possible sur la santé humaine devrait être contrôlée.

2.6. – Évaluation des effets possibles des vignes transgéniques sur les aspects technologiques

Il faut déterminer si la modification génétique a une incidence sur les paramètres technologiques (ex. : influence sur le processus de fermentation).

D – UTILISATION COMMERCIALE D'UNE VIGNE GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉE

1. Enregistrement d'une vigne génétiquement modifiée

En fonction des données obtenues à l'issue des enquêtes spécifiées à la section C ci avant et certifiées par l'institution de contrôle, l'institution officielle en charge de l'examen des vignes génétiquement modifiées sera en mesure de prendre une décision, à savoir :

- a) accepter une demande sans obligations,
- b) accepter une demande assortie d'obligation(s) spécifique(s),
- c) refuser une demande.

Dans le cas de a), il sera possible de propager et de disséminer la nouvelle vigne génétiquement modifiée. Dans le cas de b), il pourra être possible, avec certaines restrictions et recommandations, de propager et de disséminer cette nouvelle vigne génétiquement modifiée.

Dans les deux cas, la poursuite de la propagation et de la dissémination peut être suspendue si les résultats d'autres études (effectuées par exemple avec des techniques nouvelles ou précédemment inconnues) démontrent la possibilité d'un quelconque « danger ». Le matériel OGM devrait être signalé comme tel dans l'étiquetage.

2. Statut phytosanitaire

À l'instar des variétés et clones existants, une vigne génétiquement modifiée – une fois introduite sur le marché – devrait satisfaire toutes les obligations applicables dans chaque pays membre de l'OIV concernant le statut phytosanitaire des supports de propagation.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 145/2009

TRAITEMENT AU CHLORURE D'ARGENT

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin

ayant pris connaissance des travaux du groupe d'experts « Code international des pratiques œnologiques »,

Considérant l'opinion favorable donnée par le groupe « Sécurité alimentaire » lors de leur 14^{ème} session,

DECIDE:

sur proposition de la Commission II « Oenologie » d'introduire dans le « *Code international des pratiques œnologiques* », les pratiques et traitements œnologiques suivants :

DECIDE de mettre à jour le document concernant le résidu maximal de l'argent dans le vin pertinent de l'OIV

PARTIE II

Chapitre 3 : « Vins »

Traitement au chlorure d'argent

Définition :

Addition au vin de chlorure d'argent

Objectif :

Réduire les défauts olfactifs dus à l'hydrogène sulfuré et à certains mercaptans.

Prescriptions

- a) La dose utilisée ne doit pas dépasser 1g/hl
- b) Le chlorure d'argent doit être préalablement adsorbé sur un support inerte, comme le kieselguhr (terre à diatomées) ou le kaolin
- c) L'opération principale doit être précédée d'essais pour déterminer la dose de produit à ajouter.
- d) Le précipité doit être éliminé par tout moyen physique approprié
- e) Les résidus doivent être traités par une filière spécialisée dans le traitement des résidus
- f) La teneur limite en argent dans les vins traités doit être inférieure à 0,1 mg/l
- g) Le traitement doit être exécuté sous la responsabilité d'un œnologue ou d'un technicien qualifié.
- h) Le chlorure d'argent doit répondre aux prescriptions du Codex œnologique international.

Recommandation de l'OIV :

Admis.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 278/2009

MACERATION DERAISINS PASSERILLES OU DELEUR MARC DANS UN VIN

L'ASSEMBLEE GENERALE

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin

ayant pris connaissance des travaux du groupe d'experts «Technologie»,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'introduire dans la partie II du "*Code international des pratiques œnologiques*" les pratiques œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 3

Macération de raisins passerillés ou de leur marc dans un vin

Définition:

Procédé consistant à faire macérer des raisins passerillés ou atteint de pourriture noble, ou de leur marc obtenu après fermentation, dans un vin.

Objectifs :

- a) Augmenter le contenu du vin :
- * en sucres
 - * en composés phénoliques,
 - * en composés aromatiques

Prescriptions :

- a) Déterminer la durée de la macération en fonction des caractéristiques du vin, du type de raisin et du type de vin recherché.
- b) Eviter une extraction excessive des composés phénoliques par une durée de macération trop longue.
- c) le vin, les raisins passerillés et les marcs obtenus après une fermentation doivent tous être de la même vendange

Recommandation de l'OIV
Admis

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 196/2009

MACERATION (Fiche générale)

L'ASSEMBLEE GENERALE

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin

ayant pris connaissance des travaux du groupe d'experts «Technologie»,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'introduire dans la partie II du "*Code international des pratiques œnologiques*" les pratiques et traitements œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre I

MACERATION

Définition

Procédé consistant à laisser en contact pendant un temps plus ou moins prolongé les parties solides et liquides de la vendange. La macération s'accomplit avant, simultanément ou après la fermentation.

Objectif

Dissolution des substances contenues dans le raisin notamment des composés phénoliques, des arômes et leurs précurseurs.

Prescriptions

L'objectif peut être atteint :

- a) par macération selon la technique traditionnelle de cuvaison (II 1.6)
- b) par macération carbonique (II 1.7)
- c) par macération après chauffage de la vendange (II 1.8)
- d) par macération pré-fermentaire à froid pour l'élaboration des vins blancs (II 1.14)
- e) par macération pré-fermentaire à froid pour l'élaboration des vins rouges (II 1.15)
- f) par macération post-fermentaire à chaud des raisins rouges dite macération finale a chaud (II 2.3.9)
- g) par macération de raisins passerillés ou de leur marc dans un vin (II 2.3.10)

Recommandation OIV :

Se reporter aux pratiques et traitements mentionnés ci-dessus

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 336A/2009

MOÛTS – COLLAGE A L'AIDE DE CHITOSANE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant l'avis favorable du groupe d'experts « Sécurité Alimentaire »,
ayant pris connaissance des travaux du groupe d'experts « Technologie »,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'introduire dans la partie II du "Code international des pratiques œnologiques" les pratiques et traitements œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 2: Moûts

2.1.22. Collage à l'aide de chitosane

Définition :

Addition de chitosane d'origine fongique pour le collage des moûts

Objectifs :

- a) Faciliter le débouillage et la clarification
- b) Réaliser un traitement préventif des casses protéiques

Prescriptions :

- a) Les doses à utiliser sont déterminées après un essai préalable. La dose conseillée d'utilisation devrait être inférieure ou égale à 100 g/hL.
- b) Le chitosane doit répondre aux prescriptions du Codex œnologique international.

Recommandations de l'OIV :

Admis.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 336B/2009

MOÛTS – COLLAGE A L'AIDE DE CHITINE GLUCANE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant l'avis favorable du groupe d'experts « Sécurité alimentaire »
ayant pris connaissance des travaux du groupe d'experts « Technologie »,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'introduire dans la partie II du "Code international des pratiques œnologiques" les pratiques et traitements œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 2: Moûts

2.1.23. Collage à l'aide de chitine glucane

Définition :

Addition de chitine glucane d'origine fongique pour le collage des moûts

Objectifs :

- a) Faciliter le débouillage et la clarification
- b) Réaliser un traitement préventif des casses protéiques

Prescriptions :

- a) Les doses à utiliser sont déterminées après un essai préalable. La dose conseillée d'utilisation devrait être inférieure ou égale à 100 g/hL.
- b) Le chitine glucane doit répondre aux prescriptions du Codex œnologique international.

Recommandations de l'OIV :

Admis.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 337A/2009

VINS – COLLAGE A L'AIDE DE CHITOSANE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant l'avis favorable du groupe d'experts « Sécurité alimentaire »,

Considérant le travail effectué par le groupe d'experts du groupe « Technologie », DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'introduire dans la partie II du "*Code international des pratiques œnologiques*" les pratiques œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 3: Vins

3.2.12. Collage à l'aide de chitosane

Définition :

Addition de chitosane d'origine fongique pour le collage des vins

Objectifs :

- a) réduire la turbidité en précipitant les particules en suspension
- b) réaliser un traitement préventif des casses protéiques par la précipitation partielle des matières protéiques en excès

Prescriptions :

- a) Les doses à utiliser sont déterminées après un essai préalable. La dose maximale d'utilisation ne peut pas dépasser 100 g/hL.
- b) Les sédiments sont éliminés par des procédés physiques
- c) Le chitosane d'origine fongique peut s'employer seul ou conjointement avec d'autres produits admis.
- d) Le chitosane doit répondre aux prescriptions du Codex œnologique international.

Recommandations de l'OIV :

Admis.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 337B/2009

VINS – COLLAGE A L'AIDE DE CHITINE GLUCANE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant l'avis favorable du groupe d'experts « Sécurité alimentaire »,

Considérant le travail effectué par le groupe d'experts du groupe « Technologie »,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'introduire dans la partie II du "Code international des pratiques œnologiques" les pratiques œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 3: Vins

3.2.13. Collage à l'aide de chitine glucane

Définition :

Addition de chitine glucane d'origine fongique pour le collage des vins

Objectifs :

- a) réduire la turbidité en précipitant les particules en suspension
- b) réaliser un traitement préventif des casses protéiques par la précipitation partielle des matières protéiques en excès

Prescriptions :

- a) Les doses à utiliser sont déterminées après un essai préalable. La dose maximale d'utilisation doit être inférieure ou égale à 100 g/hL.
- b) Les sédiments sont éliminés par des procédés physiques
- c) Le chitine glucane d'origine fongique peut s'employer seul ou conjointement avec d'autres produits admis.
- d) Le chitine glucane doit répondre aux prescriptions du Codex œnologique international.

Recommandations de l'OIV :

Admis.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 339A/2009

VINS – COLLAGE : MODIFICATION DE LA FICHE EXISTANTE - CHITOSANE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant l'avis favorable du groupe d'experts « Sécurité alimentaire »,

Considérant le travail effectué par le groupe d'experts du groupe « Technologie »,

vu le projet OENO/TECHNO/07/337A Vins- Collage à l'aide de chitosane,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie » d'introduire dans la partie II du "*Code international des pratiques œnologiques*" les traitements œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 3: Vins

3.2.1. Collage

Ajouter dans Prescription b) :

chitosane

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 339B/2009

VINS – COLLAGE : MODIFICATION DE LA FICHE EXISTANTE - CHITINE GLUCAN

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant l'avis favorable du groupe d'experts « Sécurité alimentaire »,

Considérant le travail effectué par le groupe d'experts du groupe « Technologie »,

vu le projet OENO/TECHNO/07/337B Vins- Collage à l'aide de chitine glucan,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie » d'introduire dans la partie II du "Code international des pratiques œnologiques" les traitements œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 3: Vins

3.2.1. Collage

Ajouter dans Prescription b) :

Chitine glucan

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 338A/2009

VINS – TRAITEMENT A L'AIDE DE CHITOSANE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant l'avis favorable du groupe d'experts « Sécurité alimentaire »,

Considérant le travail effectué par le groupe d'experts du groupe « Technologie »,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'introduire dans la partie II du "*Code international des pratiques œnologiques*" les traitements œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 3: Vins

3.4.16. Traitement à l'aide de chitosane

Définition :

Addition de chitosane d'origine fongique aux vins

Objectifs :

- a) réduire les teneurs en métaux lourds notamment en fer, plomb, cadmium, cuivre
- b) prévenir la casse ferrique, casse cuivrique
- c) réduire des contaminants éventuels, en particulier l'ochratoxine A,
- d) réduire les micro-organismes indésirables notamment les *Brettanomyces*.

Prescriptions :

- a) Les doses à utiliser sont déterminées après un essai préalable. La dose maximale d'utilisation doit être inférieure ou égale à :
 - 100 g/hl pour les objectifs a) et b)
 - 500 g/hl pour l'objectif c)
 - 10 g/hl pour l'objectif d)
- b) Les sédiments sont éliminés par des procédés physiques
- c) Le chitosane d'origine fongique peut s'employer seul ou conjointement avec d'autres produits admis.
- d) Le chitosane doit répondre aux prescriptions du Codex œnologique international.

Recommandations de l'OIV :

Admis.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 338B/2009

VINS – TRAITEMENT A L'AIDE DE CHITINE GLUCANE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 ii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant l'avis favorable du groupe d'experts « Sécurité alimentaire »,

Considérant le travail effectué par le groupe d'experts du groupe « Technologie »,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'introduire dans la partie II du "Code international des pratiques œnologiques" les traitements œnologiques suivants:

PARTIE II

Chapitre 3: Vins

3.4.17. Traitement à l'aide de chitine glucane

Définition :

Addition de chitine glucane d'origine fongique aux vins

Objectifs :

- a) réduire les teneurs en métaux lourds notamment en fer, plomb, cadmium, cuivre
- b) prévenir la casse ferrique, casse cuivrique
- c) réduire des contaminants éventuels, en particulier l'ochratoxine A.

Prescriptions :

- a) Les doses à utiliser sont déterminées après un essai préalable. La dose maximale d'utilisation doit être inférieure ou égale à :
 - 100 g/hl pour les objectifs a) et b)
 - 500 g/hl pour l'objectif c)
- b) Les sédiments sont éliminés par des procédés physiques
- c) Le chitine glucane d'origine fongique peut s'employer seul ou conjointement avec d'autres produits admis.
- d) Le chitine glucane doit répondre aux prescriptions du Codex œnologique international.

Recommandations de l'OIV :

Admis.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RESOLUTION OIV/OENO 313/2009

CODEX - HEMICELLULASES

L'ASSEMBLEE GENERALE

Vu l'Article 2, paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et du groupe d'experts « Spécifications des produits œnologiques »,

DECIDE de compléter le Codex Œnologique international par la monographie suivante :

HEMICELLULASES **(activité galactanase)** **(EC 3.2.1.89 – CAS n° 58182-40-4)**

Spécifications générales

Ces enzymes ne sont pas trouvées à l'état pur mais elles sont présentes au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indications contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution concernant « les spécifications générales pour les préparations enzymatiques » qui figurent dans le Codex œnologique international.

1. Origine et application

Les hemicellulases catalysent la dégradation des hémicelluloses (galactanes, xyloglucanes, arabinoxylanes, glucuronoarabinoxylanes, mannanes, glucomannanes). Elles sont utilisées lors de la macération du raisin. Cette activité peut être estimée par l'hydrolyse des galactanes de pomme de terre.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées d'*Aspergillus niger* et/ou de mélange *Aspergillus niger* – *Trichoderma reesei*.

Activités principales accompagnant les activités Hémicellulases (arabanase, galactanase, xylanase, rhamnosidase) :

- Polygalacturonases
- Pectine / pectatylase
- Pectine méthyle estérase

Activités secondaires : protéases, cellulases, bêta-glucosidases. La clause des 50 % est applicable pour ces activités (monographie sur les préparations enzymatiques 4.1)

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

Federico CASTELLUCCI

2. Domaine d'application

La méthode de dosage a été mise au point à l'aide d'une galactanase commercialisée. Les conditions et la méthode ont été développées pour l'application aux préparations enzymatiques commerciales telles que retrouvées sur le marché œnologique.

3. Principe

Les galactanases coupent les chaînes d'arabinogalactane et libèrent ainsi les extrémités réductrices des sucres constitutifs. La mesure de l'activité galactanase est basée sur le dosage du galactose selon la méthode de NELSON (1994). En milieu alcalin, le groupement pseudoaldéhydrique des sucres réduit les ions cuivriques Cu^{2+} . Ces derniers réagissent avec le réactif arséniomolybdique en donnant une coloration bleue dont l'absorbance, mesurée à 520 nm, varie de manière linéaire avec la concentration en oses (entre 0 et 400 $\mu\text{g/mL}$).

4. Appareillage

- 4.1 agitateur magnétique chauffant
- 4.2 bain d'eau à 40°C
- 4.3 bain d'eau à 100°C
- 4.4 vase cylindrique de 100 mL
- 4.5 centrifugeuse pouvant recevoir des tubes en verre de 15 mL
- 4.6 chronomètre
- 4.7 fiole jaugées de 100 mL
 - 4.7.1 fiole jaugée de 500 mL
- 4.8 seringue de précision 200 μL
 - 4.8.1 seringue de précision 1 mL
- 4.9 pipette droite de 10 mL graduée au 1/10^e de mL
- 4.10 spectrophotomètre
- 4.11 tubes en verre de 15 mL
- 4.12 agitateur de type vortex
- 4.13 flacon en verre brun de 500 mL.
- 4.14 chambre à 4°C
- 4.15 étuve à 37°C
- 4.16 coton cardé
- 4.17 papier Kraft
- 4.18 pH mètre
- 4.19 portoir métallique pour tubes de 15 mL
- 4.20 cuves de 1 cm de parcours optique, à usage unique, pour spectrophotomètre, pour mesure dans le visible

5. Produits

- 5.1 acétate de sodium (CH_3COONa pur à 99% - PM = 82g/mole)
- 5.2 acide acétique (CH_3COOH pur à 96% - PM = 60 g/mole, densité = 1,058)
- 5.3 galactane de pomme de terre (Megazyme, lot 71201) à titre d'exemple. Si ce substrat n'est pas disponible, les substrats alternatifs doivent être validés pour cet essai.
- 5.4 sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4 pur à 99,5% - PM = 142 g/mole)
- 5.5 carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3 pur à 99,5% - PM = 105,99 g/mole)
- 5.6 tartrate de potassium et de sodium ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pur à 99% - PM = 282,2 g/mole)
- 5.7 hydrogénocarbonate de sodium anhydre (NaHCO_3 pur à 98% - PM = 84,01 g/mole)
- 5.8 sulfate de cuivre penta-hydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pur à 99% - PM = 249,68 g/mole)
- 5.9 acide sulfurique (H_2SO_4 pur à 98%) concentré

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

- 5.10 heptamolybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pur à 99% - PM = 1235,86 g/mole)
- 5.11 hydrogéoarséniate de sodium ($\text{Na}_2\text{HASO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pur à 98,5% - PM = 312,02 g/mole)
- 5.12 D-galactose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ pur à 99% - PM = 180,16 g/mole)
- 5.13 eau distillée
- 5.14 préparation enzymatique commerciale à analyser

6. Solutions

6.1 Réactifs de la solution oxydante

Ces réactifs devront être préparés en premier, compte-tenu du délai de 24 heures pour la solution D.

6.1.1 Solution A : Placer dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) successivement

20 g de sulfate de sodium anhydre (5.4)

2,5 g de carbonate de sodium anhydre (5.5)

2,5 g de tartrate de potassium et de sodium (5.6)

2 g de hydrogénocarbonate de sodium anhydre (5.7)

Dissoudre dans 80 mL d'eau distillée (5.13). Chauffer (4.1) jusqu'à dissolution et transvaser dans une fiole de 100 mL (4.7). Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée (5.13).

Conserver à 37 °C (4.15) ; s'il se forme un dépôt : filtrer sur filtre plissé.

6.1.2 Solution B :

Dissoudre 15 g de sulfate de cuivre penta-hydraté (5.8) dans 100 mL d'eau distillée (5.13) et ajouter une goutte d'acide sulfurique concentré (5.9).

6.1.3 Solution C :

Cette solution est préparée extemporanément pour avoir une bonne proportionnalité entre la densité de couleur et la quantité de glucose en mélangeant 1 mL de solution B (6.1.2) avec 24 mL de solution A (6.1.1).

6.1.4 Solution D :

Dans une fiole jaugée de 500 mL (4.7.1), dissoudre 25 g de heptamolybdate d'ammonium (5.10) dans 400 mL d'eau (5.13). Ajouter 25 mL d'acide sulfurique concentré (5.9) (refroidi sous courant d'eau froide).

Dans un vase cylindrique de 100 mL (4.4) dissoudre 3 g d'hydrogéoarséniate de sodium (5.11) dans 25 mL d'eau (5.13) et transvaser quantitativement dans la fiole jaugée de 500 mL (4.7.1) contenant le molybdate d'ammonium (5.10).

Compléter avec de l'eau (5.13) pour avoir un volume final de 500 mL.

Placer à 37°C (4.15) pendant 24 heures puis conserver à 4°C (4.14) dans un flacon en verre brun de 500 mL (4.13).

6.2 Tampon acétate de sodium (pH 4,2, 100 mmol/L)

Il est constitué des solutions A et B.

6.2.1 Solution A : acétate de sodium 0,1 M : dissoudre 0,5 g d'acétate de sodium (5.1) dans 60 mL d'eau distillée (5.13)

6.2.2 Solution B : acide acétique 0,1 M : étendre 1 mL d'acide acétique (5.2) par 175 mL d'eau distillée (5.13)

6.2.3 Préparation du tampon acétate de sodium : mélanger 23,9 mL de solution A (6.2.1) + 76,1 mL de solution B (6.2.2).

Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.18).

La solution doit être conservée à 4°C (4.14).

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

6.3 Solution de galactane de pomme de terre à 1% (p/v)

Dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7) dissoudre 1 g de galactane de pomme de terre (5.3) dans 100 mL de tampon acétate de sodium (6.2).

6.4 Solution mère de Galactose à 400µg/mL

Dissoudre 0,040 g de galactose (5.12) dans 100 mL d'eau distillée (5.13).

7. Préparation de la gamme étalon de galactose

Une gamme étalon est réalisée à partir de la solution mère de galactose (de 0 à 400 µg/mL) (6.4) telle que présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : gamme étalon de galactose

Galactose (µg/mL)	0	50	100	150	200	250	300	400
Galactose (µmole/mL)	0	0,278	0,555	0,833	1,110	1,388	1,665	2,220
Vol solution mère (µL) (6.4.)	0	125	250	375	500	625	750	1000
Vol eau distillée (µL) (5.13)	1000	875	750	625	500	375	250	0

8. Préparation de l'échantillon

Il est important d'homogénéiser la préparation enzymatique avant la prise d'échantillon, par retournement du récipient, par exemple. La solution enzymatique et les blancs devront être préparés extemporanément.

8.1 Solution enzymatique à 2 g/L

Placer 200 mg de préparation commerciale (5.14) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.7), compléter avec de l'eau distillée (5.13), agiter afin d'obtenir un mélange homogène.

8.2 Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1) dans un tube de 15 mL (4.11), boucher avec du coton cardé (4.16) recouvert de papier Kraft (4.17) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3).

9. Mode opératoire

9.1 Réaction enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 5 tubes de 15 mL (4.11) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.19) introduire 200 µL de la solution enzymatique à 2 g/l (8.1), à l'aide de la seringue de précision (4.8) 400 µL de tampon acétate de sodium (6.2), à l'aide de la seringue de précision (4.8.1), 600 µL de galactane de pomme de terre (6.3), enclencher le chronomètre (4.6)

Après agitation (4.12), les tubes bouchés avec du coton cardé (4.16) et du papier Kraft (4.17) sont placés dans le bain d'eau à 40 °C (4.2)

durant 1 mn pour le tube n°1

durant 2 mn pour le tube n°2

durant 5 mn pour le tube n°3

durant 10 mn pour le tube n°4

durant 15 mn pour le tube n°5

La réaction est stoppée en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5 immédiatement après qu'ils aient été enlevés du bain d'eau à 40°C, dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 mn.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

9.2 Dosage des substances réductrices libérées (ici le galactose)

Dans un tube de 15 mL (4.11)

placer 1 mL du milieu réactionnel (9.1)

ajouter 1 mL de solution C (6.1.3)

après agitation (4.12), le tube est placé dans le bain d'eau à 100°C (4.3) durant 10 mn.

Le tube est ensuite refroidi sous courant d'eau froide.

ajouter 1 mL de la solution D (6.1.4)

ajouter 9,5 mL d'eau (5.14) à l'aide de la pipette droite de 10 mL (4.9)

attendre 10 mn pour la stabilisation de la couleur.

Centrifuger (4.5) chacun des tubes à 5000 rpm durant 10 mn.

Placer le surnageant dans une cuve (4.20).

Mesurer aussitôt l'absorbance à 520 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (4.10).

9.3 Blancs

Opérer comme décrit en 9.1 en remplaçant la solution enzymatique à 2 g/l (8.1) par le blanc dénaturé par la chaleur (8.2). L'idéal est de réaliser la réaction enzymatique des blancs en même temps que celle de la solution enzymatique.

9.4 Gamme étalon

Opérer comme décrit en 9.2 en remplaçant le milieu réactionnel (9.1) par les différents milieux de la gamme étalon de galactose de 0 à 400 µg/mL (7).

10. Calcul

10.1 Réalisation d'une cinétique

De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).

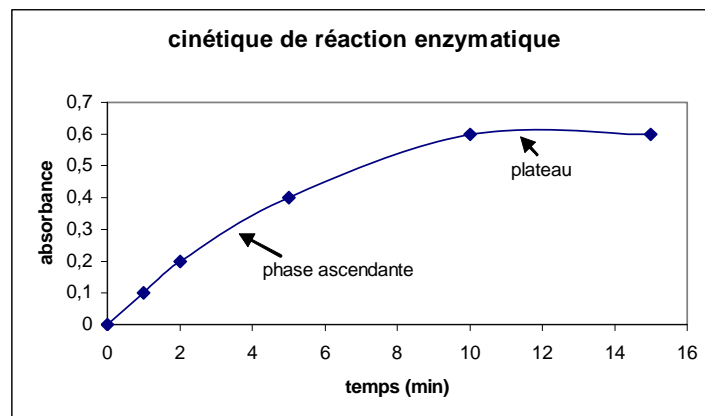


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 15 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min T=15 min.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant. Puis calculer l'équation (1) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

10.2 Réalisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage correspond à l'établissement d'un graphique ayant pour abscisse les différentes concentrations de la gamme étalon de galactose (de 0 à 2,220 µmole/mL) et en ordonnée les valeurs de densités optiques correspondantes, obtenues en 9.4. Calculer ensuite la pente (Q/T) de la droite de régression (2) résultant de la linéarité des données du graphique.

10.3 Calcul de l'activité enzymatique

A partir de la droite de régression (1) calculer l'absorbance pour un temps moyen T (par exemple 4 mn pour le cas de la figure 1) en déduire la quantité Q de galactose libéré (en µmoles) pour ce temps intermédiaire à l'aide de l'équation (2).

La formule pour calculer l'activité enzymatique en U/g de préparation est la suivante :

$$\text{Activité en U/g} = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$$

Avec Q : quantité de galactose formé en µmoles pendant un temps T (min)

V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) ici 0,2 mL

C : concentration de la solution enzymatique (g/l) ici 2 g/l

Ensuite, il est possible d'exprimer l'activité enzymatique en nanokatal. Cette unité correspond au nombre de nanomoles de produit formé par seconde dans les conditions définies par les protocoles de dosages et donc :

$$\text{Activité en nkat/g} = (\text{activité en U/g}) \times (1000/60)$$

11. Caractéristiques de la méthode

r= 0.056

R= 0.056

Sr= 0.02

S_R= 0.02

La répétabilité de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois. Ainsi, pour le dosage de la galactanase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,02 avec un pourcentage d'erreur de 9,7%. Le % d'erreur correspondant à :

$$\frac{(\text{moyenne des écarts-types des valeurs} \times 100)}{\text{moyenne des valeurs des essais}}$$

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Les essais de reproductibilité ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écart entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non »
- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.

Si la puissance est faible ($\cong 20\%$), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.

Si la puissance est élevée ($\cong 80\%$), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avons les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 2.

Dosages	Hypothèses de l'analyse de variance	Probabilité	Puissance de l'essai ($\alpha = 5\%$)	Test Newman-Keuls (*)	Test Bonferroni (**)
Galactanase	Respectées	0,00087	93%	Significatif	Significatif

Tableau 2 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi.

** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, $(t(t-1))/2$ comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%, renforcée par une appartenance à un même groupe (Test Newmann-Keuls non significatif) et considérée comme non différente au risque α de première espèce (Test Bonferroni non significatif).

12. Références Bibliographiques

NELSON N., **A photometric adaptation of the SOMOGYI method for the determination of glucose**. The may Institute for medical research of the Jewish hospital, 1944. p 375-380

Thierry Doco, et al. : « Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides, Carbohydrate Polymers, Volume 53, Issue 3, 15 August 2003, Pages 253-261, »)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 314/2009

CODEX - PECTINELYASE

L'ASSEMBLEE GENERALE

Vu l'Article 2, paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition de la Sous-Commission des méthodes et du groupe d'experts « Spécifications des produits œnologiques »

DECIDE de compléter le Codex Œnologique international par la monographie suivante :

PECTINELYASE **(activité PECTINELYASE)** **EC 4.2.2.10. – CAS n° 9033-35-6)**

Spécifications générales

Ces enzymes ne sont pas trouvées à l'état pur mais elles sont présentes au sein d'un complexe enzymatique. Sauf indications contraires, les spécifications doivent être conformes à la résolution concernant les spécifications générales pour les préparations enzymatiques qui figurent dans le Codex œnologique international.

1. Origine et application œnologique

Ces activités sont utilisées pour favoriser la macération du raisin, pour la clarification des moûts et des vins, pour améliorer la filtrabilité des moûts et des vins et le pressurage du raisin.

Les préparations enzymatiques contenant ces activités proviennent de fermentations dirigées d'*Aspergillus niger*.

Activités principales accompagnant l'activité Pectinelyase :

- Polygalacturonase
- Pectine méthyle estérase

Activités secondaires : Peuvent être considérées comme activités secondaires, mais également fort utiles au processus d'hydrolyse des substances pectiques, diverses hémicellulases telles que les xylanases ainsi que des cellulases. Dans ce cas, compte tenu de leur utilité, il n'est pas approprié d'appliquer à ces activités la clause de la résolution, sur les préparations enzymatique, qui demande que la somme des activités secondaires ne doit pas être supérieure à 50 % de la somme des activités nécessaires à la fonction recherchée puis qu'elles contribuent utilement à l'atteinte du but.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Par contre, la clause des 50% s'applique pour les activités secondaires suivantes :
protéases, bêta-glucosidases

2. Domaine d'application

La méthode de dosage a été mise au point à l'aide d'une pectinolyse commercialisée (5.5). Les conditions et la méthode ont été développées pour l'application aux préparations enzymatiques du commerce telles que retrouvées sur le marché œnologique.

3. Principe

Cette activité enzymatique se traduit par une dégradation des pectines hautement méthylées par β -élimination des acides galacturoniques méthylés. Il se crée ainsi un système de doubles liaisons conjuguées fortement délocalisées et absorbant dans l'ultra violet.

4. Appareillage

- 4.1 agitateur magnétique
- 4.2 bain d'eau à 25°C
- 4.3 bain d'eau à 100°C
- 4.4 fiole jaugée de 1000 mL
- 4.4.1 fiole jaugée de 100 mL
- 4.5 chronomètre
- 4.6 cuves de 1 cm de trajet optique en quartz, pour spectrophotomètre, pour mesure dans l'UV
- 4.7 pH mètre
- 4.8 seringues de précision 100 μ L
- 4.8.1 seringues de précision 1000 μ L
- 4.9 spectrophotomètre
- 4.10 tubes de 15 mL
- 4.11 agitateur de type vortex
- 4.12 portoir métallique pour tubes de 15 mL
- 4.13 chambre à 4°C
- 4.14 coton cardé
- 4.15 papier Kraft

5. Produits

- 5.1 Pectine d'agrumes de degré d'estérification 63-66% (Pectin from citrus peel, Fluka, Réf. 76280), à titre d'exemple.
- 5.2 Hydroxyde de sodium (NaOH, pur à 99% - PM = 40 g/mole)
- 5.3 Acide citrique ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, pur à 99,5% - PM = 210,14 g/mole)
- 5.4 Dihydrogénophosphate de sodium ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, pur à 99% - PM = 156,01 g/mole)
- 5.5 Pectinolyse d'*Aspergillus niger* purifiée (Sigma ; 30 U; 50-150 U/mg prot, réf : P7052), à titre d'exemple. Une unité, entraîne une variation d'absorbance à 235 nm de 1 par minute à 40 °C.
- 5.6 Eau distillée
- 5.7 Préparation enzymatique commerciale à analyser

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

6. Solutions

6.1 Solution d'Hydroxyde de sodium 1M

Introduire 40 g d'hydroxyde de sodium (5.2) dans une fiole jaugée de 1000mL (4.4) et compléter avec de l'eau distillée (5.6).

6.2 Tampon Mc Ilvaine (Devries *et al.*).

Il est constitué des solutions A et B.

6.2.1 Solution A : acide citrique à 100 mM : dissoudre 4,596 g d'acide citrique (5.3) dans 200 mL d'eau distillée (5.6)

6.2.2 Solution B : dihydrogénophosphate de sodium à 200 mM : dissoudre 6,25 g de dihydrogénophosphate de sodium (5.4) dans 200 mL d'eau distillée (5.6).

6.2.3 Préparation du tampon Mac Ilvaine

Mélanger 50% de solution A (6.2.1) + 50% de solution B (6.2.2) et ajuster le pH à 6 à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium (6.1).

La solution doit être conservée à 4°C (4.13). Vérifier le pH du tampon à l'aide d'un pH mètre (4.7)

6.3 Solution de Pectine d'agrume à 1% (p/v)

Dissoudre 0,5 g de pectine (5.1) dans 50 mL de tampon Mc Ilvaine (6.2).

7. Préparation de l'échantillon

7.1 Solution enzymatique à 10 g/l

Placer 1g de préparation commerciale (5.7) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.4.1), compléter avec de l'eau distillée (5.6), agiter (4.1) afin d'obtenir un mélange homogène.

7.2. Blanc dénaturé par chauffage

Placer 10 mL de la solution enzymatique à 10 g/l (7.1) dans un tube de 15 mL (4.10), boucher avec du coton cardé (4.14) recouvert de papier Kraft (4.15) et plonger le tube durant 5 minutes dans le bain d'eau à 100°C (4.3).

8. Mode opératoire

8.1 Réaction enzymatique : Les tubes sont réalisés en double au minimum.

Dans 5 tubes de 15 mL (4.10) numérotés de 1 à 5, placés dans un portoir (4.12) introduire 400 µL de Tampon Mc Ilvaine (6.2) à l'aide d'une seringue de précision 1000 µL (4.8.1)

100 µL de la solution enzymatique à 10 g/l (7.1) à l'aide d'une seringue de précision 100 µL (4.8)

500 µL de solution de pectine d'agrume (6.3), enclencher le chronomètre (4.5)

Après agitation (4.11), les tubes bouchés avec du coton cardé (4.14) et du papier Kraft (4.15), sont placés dans le bain d'eau à 25°C (4.2)

durant 1 mn pour le tube n°1

durant 2 mn pour le tube n°2

durant 5 mn pour le tube n°3

durant 10 mn pour le tube n°4

durant 15 mn pour le tube n°5

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

La réaction est stoppée par un réchauffement rapide (30 secondes max) en plaçant chacun des tubes numérotés de 1 à 5, dans le bain d'eau à 100°C (4.3) et en ajoutant des solutions concentrées acide ou basique comme réactif d'arrêt . Les tubes sont ensuite refroidis sous courant d'eau froide.

8.2 Dosage des substances libérées

Le milieu réactionnel (8.1) est dilué au dixième avec de l'eau distillée (5.6). La dilution est placée dans une cuve (4.6) de 1 cm de parcours optique. Mesurer aussitôt l'absorbance à 235 nm, à l'aide d'un spectrophomètre (4.9).

8.3 Blancs

Opérer comme décrit en 8.1 en remplaçant la solution enzymatique par le blanc dénaturé par chauffage (7.2).

9. Calculs

9.1 Réalisation d'une cinétique

De manière générale, le calcul de l'activité enzymatique ne peut se faire que lorsque le substrat et l'enzyme ne sont pas en quantités limitantes. On se situe alors dans la phase ascendante de la représentation cinétique : l'activité enzymatique est linéaire dans le temps. Dans le cas contraire, l'activité serait sous estimée (Figure 1).

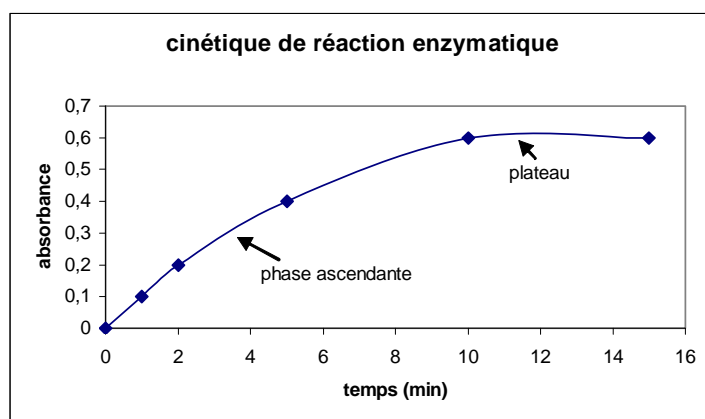


Figure 1 : Cinétique de réaction enzymatique

Une cinétique sur 15 minutes est réalisée. L'activité concernée est mesurée à T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min T=15

Après avoir réalisé la cinétique de réaction enzymatique, établir la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de réaction. L'absorbance correspond à la différence entre l'absorbance à un temps T de la préparation enzymatique et du blanc correspondant.

Puis calculer la pente (DO/T) de la droite de régression en ne prenant en compte que les points de la phase ascendante (voir figure 1).

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

9.2 Calcul de l'activité enzymatique

Le calcul de l'activité enzymatique de la pectinelyase s'effectue grâce au coefficient d'extinction molaire de la molécule formée ($\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ainsi la formule à appliquer est la suivante :

$$\text{Activité en U/g} = (\text{DO}_T/T)/(0.1/V) \times (1000/(5.5/C))$$

Avec DO_T : Valeur de l'absorbance au temps T (min)

V : quantité de solution enzymatique introduite (mL) : ici 0,1 mL

C : concentration de la solution enzymatique (g/l) : ici 10 g/l

Il est désormais possible d'exprimer d'activité enzymatique en nanokatal. Cet unité correspond aux nombres de nanomoles de produit formés par seconde sous les conditions définies par les protocoles de détermination et par conséquent :

$$\text{Activité en nkat/g} = (\text{activité en U/g}) \times (1000/60)$$

10. Caractéristiques de la méthode

r= 0.056

R= 0.056

Sr= 0.02

S_R= 0.02

La répétabilité de la méthode est estimée par le biais de la moyenne des écarts-types des valeurs d'absorbance issus d'un même prélèvement de la préparation enzymatique, dosé 5 fois. Ainsi, pour le dosage de la pectine lyase la moyenne des écarts-types des valeurs est de 0,01 avec un pourcentage d'erreur de 4,66. Le % d'erreur correspondant à :

$$\frac{(\text{moyenne des écarts-types des valeurs} \times 100)}{\text{moyenne des valeurs des essais}}$$

Ainsi, la méthode de dosage telle que présentée est jugée répétable.

Les essais de reproductibilité ont été effectués à l'aide de 2 préparations enzymatiques et 5 prises d'échantillons pour chacune.

Il a été utilisé 2 tests qui ont permis de déterminer la bonne reproductibilité de la méthode :

- l'analyse de variance (étude de la probabilité d'apparition d'écarts entre les prises d'échantillons). L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de k moyennes. Réaliser l'analyse de variance consiste à rechercher si l'effet « traitement » est « significatif ou non »

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

- la puissance de l'essai au risque α de première espèce (5%) – Le risque α de première espèce est le risque de décider que des traitements effectivement identiques sont différents.

Si la puissance est faible ($\cong 20\%$), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais il existe peu de chance de voir une différence s'il en existait une réellement.

Si la puissance est élevée ($\cong 80\%$), cela veut dire qu'aucune différence n'a été décelée entre les traitements, mais, s'il en existe une, nous avons les moyens de la voir.

Les résultats sont donnés au tableau 1.

Dosages	Hypothèses de l'analyse de variance	Probabilité	Puissance de l'essai ($\alpha = 5\%$)	Test Newman-Keuls (*)	Test Bonferroni (**)
PL	Respectées	0,00725	87%	Significatif	Significatif

Tableau 1 : Analyse de variance – étude de l'effet prise d'échantillon

* Test Newmann-Keuls : ce test de comparaison de moyennes permet de constituer des groupes homogènes de traitements : ceux appartenant à un même groupe sont considérés comme non différents au risque α de première espèce choisi

** Test de Bonferroni : aussi appelé « test du t corrigé », le test de Bonferroni permet de réaliser toutes les comparaisons 2 à 2 de moyenne, c'est à dire, $(t(t-1))/2$ comparaisons avant traitements, en respectant le risque α de première espèce choisi.

Ainsi, les essais mis en place permettent de voir une différence s'il en existe une réellement (puissance de l'essai forte), de plus la méthode de dosage présente une probabilité d'apparition d'écart d'activité (entre prises d'échantillons) inférieure à 5%.

11. Références Bibliographiques

DE VRIES J.A., F. M. ROMBOUTS F.M., VORAGEN A.G.J., PILNIK W. **Enzymatic degradation of apple pectins**. Carbohydrate Polymers, 2, 1982, 25-33.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 328/2009

BACTERIES LACTIQUES - Modification

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 iii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition du groupe d'experts « Microbiologie » et du groupe d'experts « spécification des produits œnologiques » ,

DECIDE de remplacer dans le Codex œnologique international, la monographie existante (Oeno 15/2003) par la monographie suivante et d'adapter en conséquence la résolution (17/2003):

BACTERIES LACTIQUES

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les bactéries lactiques sont utilisées en œnologie pour effectuer la fermentation malolactique. Elles doivent appartenir aux genres *Oenococcus* (*Leuconostoc*), *Lactobacillus* et *Pediococcus* et doivent avoir été isolées des raisins, des moûts ou des vins ou être dérivées de ces bactéries.

L'utilisation de bactéries génétiquement modifiées doit être soumise à l'autorisation préalable des autorités compétentes.

Les souches de bactéries lactiques doivent être conservées dans les conditions favorisant leur stabilité génétique.

Une bactérie lactique utilisable en œnologie doit donc transformer l'acide malique du moût ou du vin en acide lactique et en dioxyde de carbone, ne devrait produire des amines biogènes qu'en quantités les plus faibles possibles, et ne doit pas donner de faux goûts.

2. ETIQUETAGE

Doivent figurer sur l'étiquette:

- Le nom du genre, la ou les espèces ainsi que la ou les références de souches dans le cas où il existe un organisme d'enregistrement
- L'entité de l'obteneur ou du sélectionneur
- Le mode d'emploi ou la méthode et les éventuels additifs de réactivation préconisés par le fabricant.
- Le nombre minimum de cellules revivifiables par gramme de préparation qui est garanti par le fabricant.
- Le numéro de lot de fabrication, en plus de la date d'expiration et des conditions de stockage avec une indication par le fabricant d'une température de stockage conseillée.
- Le cas échéant, l'indication que les bactéries lactiques ont été obtenues par modifications génétiques ainsi que le ou les caractères modifiés.
- Les additifs

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

3. CARACTERES

Elles sont commercialisées, soit sous forme liquide, soit sous forme congelée, soit déshydratée par lyophilisation ou séchage, en culture pure ou en association de cultures pures.

4. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

4.1 - Humidité pour les bactéries lyophilisées ou sèches Mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105°C jusqu'à poids constant (environ 3 heures)

La teneur maximale doit être inférieure à 8 %.

4.2 - Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de matière sèche.

4.3 - Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.4 - Arsenic

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure 3 mg/kg de matière sèche.

4.5 - Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.6 - Bactéries lactiques revivifiables

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).

Le nombre doit être supérieur ou égal à 10^8 UFC/g ou 10^8 UFC/ml pour les bactéries lactiques sous forme liquide ou congelée.

Le nombre doit être supérieur ou égal à 10^{11} UFC/g pour les bactéries lactiques sous forme lyophilisée ou sèche.

4.7 - Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

Le nombre doit être inférieur à 10^3 UFC/g.

4.8 - Bactéries acétiques contaminantes

Procéder au dénombrement selon les méthodes figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Le nombre de bactéries acétiques doit être inférieur à 10^3 UFC/ml pour les bactéries acétiques sous forme liquide ou congelée ou 10^4 UFC/g pour les bactéries acétiques sous forme lyophilisée ou sèche. La somme *Acetobacter* + *Gluconobacter* doit être inférieure à 10^3 UFC/ml pour les bactéries acétiques sous forme liquide ou congelée ou 10^4 UFC/g pour les bactéries acétiques sous forme lyophilisée ou sèche.

4.9 – Levures contaminantes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Le nombre de cellules revivifiables de levures contaminantes total doit être inférieur à 10^3 UFC/g pour les bactéries sous forme lyophilisée ou sèche ou 10^2 UFC/ml pour les bactéries sous forme liquide ou congelée.

4.10 - Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g.

4.11 - *Pseudomonas aeruginosa*¹

4.12 - *Escherichia coli*

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour *Escherichia coli*. TEM figurant en annexe

Une suspension mère de bactéries lactiques est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de bactéries lactiques pour 10 ml de solution (volume total). 2 mL de la solution mère sont transférés dans chaque plaque en utilisant 5 plaques différentes.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.²

4.13 - Staphylocoques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international. La présence de staphylocoques est évaluée par une culture d'enrichissement sur milieu liquide Giolitti et Cantoni suivi d'une confirmation sur milieu solide Baird Parker figurant en annexe

Une suspension mère de bactéries lactiques est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de bactéries lactiques pour 10 ml de solution (volume total). 10 ml de suspension mère sont utilisés pour inoculer un milieu Giolitti et Cantoni au Tween 80 double concentration. Les cultures sont incubées 48 h à 37 °C.

Dans le cas où des tubes de milieu Giolitti et Cantoni donnent une réponse positive, la présence de Staphylocoques est confirmée par isolement sur milieu solide Baird Parker. Une anse des milieux de culture positif sont utilisée pour inoculer des milieux solides BP de sorte à obtenir des colonies isolées. L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.³

4.14 - Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour coliformes. gélose au désoxycholate figurant en annexe.

Une suspension mère de bactéries lactiques est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de bactéries lactiques pour 10 ml de solution (volume total). 2 mL de la solution mère sont transférés dans chaque plaque en utilisant 5 plaques différentes.

Le nombre doit être inférieur à 10^2 UFC/g. ⁴

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION

Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant.

¹ Point étudié ultérieurement par le groupe d'expert "Microbiologie"

² Annexe 1

³ Annexe 1

⁴ Annexe 1

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

METHODES D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUES

(Amendement de résolution 17/2003 du chapitre II du Codex œnologique international)

A. point 1

1. Rehydratation préalable des bactéries lactiques

- peser 1 g de bactéries lactiques **en conditions d'asepsie**,
- ajouter stérilement 100 ml de **solution de saccharose 5% dans l'eau à 36-40°C**
- homogénéiser doucement à l'aide d'un barreau ou d'un agitateur magnétique pendant 5 mn
- laisser ensuite pendant 20 mn toujours à température de **36-40°C** ;
- homogénéiser ensuite pendant 5 mn à température ambiante
- prélever stérilement 10 ml et procéder aux contrôles microbiologiques.

B. remplacer le composant milieu Agar par l'Agar bactériologique

C. Ajouter les paragraphes suivants:

7.2 Pour la recherche d'*Acetobacter*

Milieu Acb/s agar

Composition

Extrait de levure	30 g
Alcool 95% vol. après stérilisation	20 ml
Vert de bromocrésol (sol. 2,2%)	1 ml
Agar bactériologique 2%	
Eau	q.s.p. 1000 ml

Stérilisation à 120 °C pendant 20 mn

Ajouter directement dans la boîte de Pétri 0,1 ml d'une solution de pénicilline à 0,25% dans l'alcool pur

Ajouter directement dans la boîte de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de pimarinine à 25% m/v

Incuber en aérobie à 25 °C pendant 7 jours

7.3 - Pour la recherche de *Gluconobacter*

Milieu Gcb/s agar

Composition

autolysat de levure	10 g
glucose	3 g
CaCO ₃	3 g
agar bactériologique 2%	
eau	q.s.p. 1000 ml

Stérilisation à 120 °C pendant 20 mn

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Ajouter directement dans la boîte de Pétri 0,1 ml d'une Solution de pénicilline à 0,25% dans l'alcool pur

Ajouter directement dans la boîte de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de pimarinine à 25% m/v

(le CaCO₃ facilite la reconnaissance des colonies de *Gluconobacter* qui le dissout en produisant une zone circulaire plus claire autour de la colonie)

Incuber en aérobie à 25 °C pendant 7 jours.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

ANNEXE 1

EXAMEN DES MÉTHODES DE RECHERCHE DES COLIFORMES, *Escherichia coli* et *Staphillococcus*

MILIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR COLIFORMES. GÉLOSE AU DÉSOXYCHOLATE

Ingrédients/l

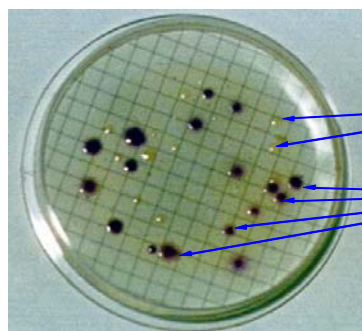
Peptone	10,0 g
Lactose	10,0 g
Désoxycholate de sodium	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,0 g
Citrate ferrique d'ammonium	1,0 g
Citrate de sodium	1,0 g
Gélose	15,0 g
Rouge neutre	0,03 g

(Inhibition de la flore associée aux coliformes)



MILIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR *Escherichia coli*. TEM

Le lauryl sulfate de sodium et le désoxycholate de sodium sont utilisés comme facteurs sélectifs, en raison de leurs capacités à inhiber le développement de cocci Gram + et bactéries sporulées. Le caractère différentiel de cette méthode résulte du chromogène 5-brome-6-chlore-indolyle- β -D-glucuronide.



Autres coliformes

Jaune

Escherichia coli

Magenta

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

Federico CASTELLUCCI

MILIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR *Staphillococcus*

Milieu Giolitti et Cantoni

Composition (g) pour 1 litre de milieu :

Tryptone : 10,0.

Extrait de viande : 5,0.

Extrait autolytique de levure : 5,0.

Glycine : 1,2.

Mannitol : 20,0.

Pyruvate de sodium : 3,0.

Chlorure de sodium : 5,0.

Chlorure de lithium : 5,0.

Tween 80 : 1,0.

pH du milieu: 6,9 ± 0,2.

Milieu solide Baird Parker

Composition (g/l)

Tryptone : 10,0.

Extrait de viande : 5,0.

Extrait autolytique de levure : 1,0.

Sodium pyruvate : 10,0.

Glycine : 12,0.

Lithium chlorure : 5,0.

Agar bactériologique : 20

Emulsion de jaune d'oeuf : 47 ml.

Tellurite de potassium à 3,5% : 3 ml.

Sulfaméthazine 0,05 g/l (s'il est nécessaire d'inhiber *Proteus*)

pH du milieu : 7,2 ± 0,2.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 329/2009

CODEX- LEVURES SECHES ACTIVES - modification

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'Article 2, paragraphe 2 iii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin,

Sur proposition du groupe d'experts « Microbiologie » et la Sous-commission « Méthodes d'analyse »,

DECIDE de remplacer dans le Codex œnologique international la monographie existante (Oeno 16/2003) par la monographie suivante dans ledit Codex et d'adapter en conséquence la résolution (17/2003)

LEVURES SECHES ACTIVES (L.S.A.) *Saccharomyces spp.*

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les levures sont utilisées pour l'ensemencement des moûts ou des vins. Elles se présentent sous forme déshydratée.

Le taux d'ensemencement est laissé à l'appréciation de l'utilisateur.

Les levures utilisées doivent avoir été isolées des raisins, des moûts ou des vins ou le résultat d'hybridation, ou dérivées de ces mêmes levures. L'utilisation de levures œnologiques génétiquement modifiées doit être soumise à l'autorisation préalable des autorités compétentes. Les levures œnologiques doivent être conservées dans les conditions qui favorisent leur stabilité génétique.

2. ETIQUETAGE

Doivent figurer sur l'étiquette:

- Le nom du genre, la ou les espèces ainsi que la ou les références des souche dans le cas où il existe un organisme d'enregistrement
- Entité de l'obteneur ou du sélectionneur
- Le mode d'emploi ou la méthode et le milieu de réactivation préconisé par le fabricant.
- Le nombre minimum de cellules revivifiables par gramme (UFC déterminé selon l'annexe) de poudre qui est garanti par le fabricant, à une température de conservation en dessous de 15°C
- Le numéro de lot de fabrication, la date d'expiration et les conditions de stockage
- Le cas échéant, l'indication que les levures ont été obtenues par modifications génétiques ainsi que le ou les caractères modifiés.
- Les additifs, y compris les substances utilisées lors des opérations de séchage

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

3. CARACTÈRES

Elles sont présentées **typiquement** sous forme de granules ronds ou vermiculés obtenus par séchage d'une culture concentrée de levures.

4. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

4.1 - Humidité

Mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105 °C jusqu'à poids constant (environ 3 heures).

La teneur maximale doit être inférieure à 8 %.

4.2- Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure à 2 mg/kg de matière sèche.

4.3 - Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.4 - Arsenic

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure 3 mg/kg de matière sèche.

4.5 - Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.6 - Levures revivifiables

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Le nombre doit être supérieur ou égale à 10^{10} UFC/g.

NB : Ce dénombrement ne s'applique pas quand les levures commercialisées ne sont pas des *Saccharomyces spp.* ou bien sont des mélanges de *Saccharomyces spp.* et *non Saccharomyces*.

4.7 - Levures d'une espèce différente de celle de la souche indiquée sur l'étiquetage

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

Le nombre doit être inférieur à 10^5 UFC/g.

4.8 - Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Le nombre doit être inférieur à 10^3 UFC/g.

4.9 - Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Le nombre doit être inférieur à 10^5 UFC/g.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

4.10 - Bactéries acétiques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Le nombre doit être inférieur à 10^4 UFC/g.

4.11 - Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g.

4.12 - *Escherichia coli*

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour *Escherichia coli*. TEM figurant en annexe

Une suspension mère de levures sèches actives est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de levures sèches actives pour 10 ml de solution (volume total). 2 mL de la solution mère sont transférés dans chaque plaque en utilisant 5 plaques différentes.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.13 - Staphylocoques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international. La présence de staphylocoques est évaluée par une culture d'enrichissement sur milieu liquide Giolitti et Cantoni suivi d'une confirmation sur milieu solide Baird Parker figurant en annexe

Une suspension mère de levures sèches actives est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de levures sèches actives pour 10 ml de solution (volume total). 10 ml de suspension mère sont utilisés pour inoculer un milieu Giolitti et Cantoni au Tween 80 double concentration. Les cultures sont incubées 48 h à 37 °C.

Dans le cas où des tubes de milieu Giolitti et Cantoni donnent une réponse positive, la présence de Staphylocoques est confirmée par isolement sur milieu solide Baird Parker. Une anse des milieux de culture positif sont utilisée pour inoculer des milieux solides BP de sorte à obtenir des colonies isolées.

L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.14 - Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international en utilisant le milieu sélectif-différentiel pour coliformes. gélose au désoxycholate figurant en annexe.

Une suspension mère de levures sèches actives est réalisée dans une solution Tryptone-sel à raison de 1 g de levures sèches actives pour 10 ml de solution (volume total). 2 mL de la solution mère sont transférés dans chaque plaque en utilisant 5 plaques différentes.

Le nombre doit être inférieur à 10^2 UFC/g.¹

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

6. CONSERVATION

Conserver à des températures inférieures à 15°C dans les paquets non ouverts.

Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant.

¹ Voir annexe 1

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

**METHODES D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUES
(AMENDEMENT DE LA RESOLUTION 17/2003)**
(à faire figurer au chapitre II du Codex œnologique international)

A : point 1

1. Réhydratation préalable des levures sèches actives (LSA)

- peser 1 g de LSA en conditions d'asepsie;
- ajouter stérilement 100 ml d'une solution de saccharose à 5% dans l'eau entre 30-40°C selon les indications du fabricant;
- homogénéiser doucement à l'aide d'un barreau ou d'un agitateur magnétique pendant 5 mn;
- arrêter l'agitation et laisser reposer pendant 20 minutes, à une température de 25-30 °C;
- homogénéiser de nouveau à température ambiante pendant 5 mn;
- prélever stérilement 10 ml et procéder ensuite aux contrôles microbiologiques sur la solution mère homogénéisée.

B : Dans les paragraphes « Milieu... », remplacer « Agar agar bactériologique » par « Agar bactériologique »

C : Ajouter les paragraphes suivants :

7.2 Pour la recherche d'Acetobacter

Milieu Acb/s agar

Composition

Extrait de levure	30 g
Vert de bromocrésol (sol. 2,2%)	1 ml
Agar bactériologique	2%
Eau	q.s.p. 1000 ml

Stérilisation à 120 °C pendant 20 mn

Ajouter 20ml d'alcool 95% vol.

Ajouter directement dans la boîte de Pétri 0,1 ml d'une solution de pénicilline à 0,25% dans l'alcool pur

Ajouter directement dans la boîte de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de pimarinine à 25% m/v

Incuber en aérobie à 25 °C pendant 7 jours

7.3 - Pour la recherche de *Gluconobacter*

Milieu Gcb/s agar

Composition

autolysat de levure	10 g
glucose	3 g
CaCO ₃	3 g
agar bactériologique	2%
eau	q.s.p. 1000 ml

Stérilisation à 120 °C pendant 20 mn

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Ajouter directement dans la boîte de Pétri 0,1 ml d'une solution de pénicilline à 0,25% dans l'alcool pur

Ajouter directement dans la boîte de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de piméricine à 25% m/v (le CaCO₃ facilite la reconnaissance des colonies de *Gluconobacter* qui le dissout en produisant une zone circulaire plus claire autour de la colonie)

Incuber en aérobie à 25 °C pendant 7 jours

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

ANNEXE 1

EXAMEN DES MÉTHODES DE RECHERCHE DES COLIFORMES, *Escherichia coli* et *Staphillococcus*

MILIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR COLIFORMES. GÉLOSE AU DÉSOXYCHOLATE

Ingrédients/l

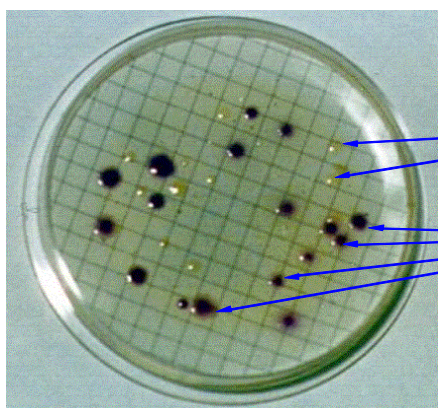
Peptone	10,0 g
Lactose	10,0 g
Désoxycholate de sodium	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,0 g
Citrate ferrique d'ammonium	1,0 g
Citrate de sodium	1,0 g
Gélose	15,0 g
Rouge neutre	0,03 g

(Inhibition de la flore associée aux coliformes)



MILIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR *Escherichia coli*. TEM

Le lauryl sulfate de sodium et le désoxycholate de sodium sont utilisés comme facteurs sélectifs, en raison de leurs capacités à inhiber le développement de cocci Gram + et bactéries sporulées. Le caractère différentiel de cette méthode résulte du chromogène 5-brome-6-chlore-indolye- β -D-glucuronide.



Autres coliformes

Jaune

Escherichia coli

Magenta

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

MILIEU SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL POUR *Staphilococcus*

Milieu Giolitti et Cantoni

Composition (g) pour 1 litre de milieu :

Tryptone : 10,0.

Extrait de viande : 5,0.

Extrait autolytique de levure : 5,0.

Glycine : 1,2.

Mannitol : 20,0.

Pyruvate de sodium : 3,0.

Chlorure de sodium : 5,0.

Chlorure de lithium : 5,0.

Tween 80 : 1,0.

pH du milieu: $6,9 \pm 0,2$.

Milieu solide Baird Parker

Composition (g/l)

Tryptone : 10,0.

Extrait de viande : 5,0.

Extrait autolytique de levure : 1,0.

Sodium pyruvate : 10,0.

Glycine : 12,0.

Lithium chlorure : 5,0.

Agar bactériologique : 20

Emulsion de jaune d'oeuf : 47 ml.

Tellurite de potassium à 3,5% : 3 ml.

Sulfaméthazine 0,05 g/l (s'il est nécessaire d'inhiber *Proteus*)

pH du milieu : $7,2 \pm 0,2$.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 351/2009

DETERMINATION DE LA CAPACITE D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE A COUPER LES CHAINES PECTIQUES PAR LA MESURE DE LA VISCOSITE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition de la Sous-Commission « Méthodes d'analyse » et du groupe d'experts « Spécification des produits œnologiques »,

DECIDE, sur proposition de la commission II « Œnologie », de compléter le Chapitre II du Codex œnologique international par les techniques analytiques et de contrôle suivantes :

DETERMINATION DE LA CAPACITE D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE A COUPER LES CHAINES PECTIQUES PAR LA MESURE DE LA VISCOSITE

1. PRINCIPE

On se propose ici de mesurer la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire de moitié la viscosité d'une solution standard, dans des conditions déterminées de pH, de température et de temps.

C'est une mesure purement technologique destinée à tester l'efficacité clarifiante réelle de l'enzyme. Elle rend compte essentiellement de l'activité "pectinase" qui ne peut pas être déduite directement de la libération de l'acide galacturonique dans le milieu.

Remarque

Pour mesurer l'activité de l'enzyme, deux approches peuvent être réalisées :

- soit le temps que met une concentration donnée d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié,
- soit la concentration nécessaire d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié dans un temps donné.

Des tests montrent que, tant que le substrat n'est pas limitant :

- dans le premier cas, le logarithme de la viscosité (temps d'écoulement) est inversement proportionnel au temps de réaction et,
- dans le deuxième cas, le logarithme de la viscosité est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme dans le milieu.

Dans un cas comme dans l'autre, il est facile de trouver, soit le temps, soit la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire la viscosité de moitié à partir d'une gamme judicieusement choisie.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

2. CONDITIONS REACTIONNELLES

Milieu tampon phosphate 70 mmol/l et citrate 30 mmol/l

Substrat : Pectine de pomme estérifiée à 70-75% (par ex : Sigma P 8471), diluée à 10 g/l dans le tampon.

pH = 3,5

Température : 30 °C

Temps de réaction : 15 minutes.

Pectinase: gamme de concentrations encadrant environ 10 mg/l de poids sec d'enzyme dans l'échantillon soit par exemple 0,5 mg dans 50 ml de substrat. Ceci correspondant à la quantité d'enzyme susceptible de faire diminuer la viscosité du substrat de moitié en 15 minutes dans les conditions décrites ci-dessus.

3. APPAREILLAGE

3.1 Thermostat à bain ou à circulation d'eau à 30 °C ± 1 °C

3.2 Viscosimètre à écoulement (A.3.1 : Fig. 2) ayant une valeur d'eau - c'est-à-dire le temps d'écoulement de l'eau entre les deux repères - de 18 à 20 secondes environ (soit un capillaire de diamètre de 0,5 à 0,6 mm environ)

3.3 Chronomètre

3.4 Balances analytiques (sensibilité 0.001g).

3.5 pH-mètre.

3.6 Agitateur magnétique, verrerie traditionnelle de laboratoire.

3.7 Filtres rapides en papier.

3.8 Micropipettes ou microseringues permettant de délivrer des volumes de 5 à 500 µl.

4. PRODUITS PURS

4.1 Acide citrique pur (99.5%)

4.2 Hydrogénophosphate de sodium dihydrate pur ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (99.0%)

4.3 Pectine de pomme estérifiée à 70-75% de pureté supérieure à 90 % (par ex : Sigma P 8471),

4.4 Eau distillée ou désionisée

4.5 Hydroxyde de sodium pur (98%)

4.6 Acide chlorhydrique pur (11,5 M) (33.5%)

4.7 Pectinase dont il faut mesurer l'activité.

5. SOLUTIONS

Chaque solution doit être homogénéisée avant l'utilisation

5.1 Hydroxyde de sodium 2M

Peser 80 g d'hydroxyde de sodium pur (4.5) dans une fiole jaugée de 100 ml dissoudre dans de l'eau désionisée (4.4) ajuster au trait de jauge après dissolution complète et refroidissement.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.2 Acide chlorhydrique 2 M

Dans une fiole jaugée de 100 ml à moitié remplie d'eau désionisée placer la quantité suffisante d'acide chlorhydrique pur (4.6) pour obtenir une solution finale 2M, (après avoir complété jusqu'au trait de jauge).

5.3 Tampon phosphate 47 mmol/l, citrate 53 mmol/l, pH 3,5

5.3.1 Placer 800 ml d'eau désionisée (4.4) dans un ballon jaugé de 1000 ml

5.3.2 peser 11,22 g d'acide citrique (4.1)

5.3.3 peser 8,30 g de hydrogénophosphate de sodium dihydrate pur ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (4.2)

5.3.4 transférer les produits chimiques pesés quantitativement dans le ballon jaugé de 1000 ml tout en remuant

5.3.5 mélanger jusqu'à entière dissolution

5.3.6 ajuster le pH à $3,50 \pm 0,05$, à la température ambiante, avec de l'hydroxyde de sodium 2 M (5.1), ou l'acide chlorhydrique 2 M (5.2) selon le pH initial

5.3.7 ajuster au trait de jauge par l'eau désionisée (4.4). Mélanger

Stabilité : 8 jours à la température ambiante.

5.4. Substrat : Pectine de pomme (4.3),

5.4.1 Placer un récipient cylindrique de 400 ml dans un bain d'eau thermostatée à $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ sur un agitateur rotatif

5.4.2 ajouter 250 ml de tampon à pH 3,5 (5.3), exactement mesuré, dans le récipient cylindrique

5.4.3 maintenir une agitation douce à $40 \text{ }^\circ\text{C}$

5.4.4 peser $2,500 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de pectine (4.3)

5.4.5 ajouter lentement la pectine sous forte agitation

5.4.6 puis agiter lentement pendant 60 minutes en maintenant la température à $40 \text{ }^\circ\text{C}$

5.4.7 arrêter de remuer et refroidir à $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$

5.4.8 filtrer sur papier filtre rapide (3.8) si nécessaire (présence de grumeaux)

Stabilité : 24 heures à la température ambiante.

5.5 Solution de pectinase à 100 g/l de poids sec (4.7)

5.5.1 peser $2,50 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de pectinase en poudre ou granulés

5.5.2 transférer dans un ballon jaugé de 25 ml

5.5.3 ajuster au trait de jauge par le tampon à pH 3,5 (5.3)

5.5.4 dissoudre par agitation pendant 20 minutes sur un agitateur magnétique

Filtrer sur papier filtre rapide si l'enzyme est immobilisée sur un matériau insoluble à l'aide d'un filtre rapide (3.7)

5.5.5 Dans le cas de préparation enzymatique liquide, utiliser directement celle-ci.

Stabilité : 4 heures à la température ambiante.

6. MESURES

6.1 Placer le viscosimètre dans le bain d'eau à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ou utiliser tout dispositif permettant de faire la mesure de viscosité à $30 \text{ }^\circ\text{C}$

6.2 Mesurer la viscosité (en fait le temps d'écoulement entre les deux traits du viscosimètre) de la solution tampon à pH 3,5, soit t_0 . Ce temps doit être proche de 20 secondes pour un capillaire de 0,5 à 0,6 mm de diamètre.

6.3 Mesurer le temps d'écoulement de la solution de pectine à 10 g/l soit T_p , ce temps doit être de l'ordre de 200 secondes ou plus.

6.4 Préparer une série de 4 ballons jaugés contenant 50 ml de pectine à 10 g/l, les placer dans le bain d'eau à $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

6.5 Ajouter dans le premier ballon, 5µl de la solution d'enzyme à 100 g/l, homogénéiser. Puis toutes les 15 minutes environ rajouter successivement dans les autres fioles : 15 µl, 35 µl et enfin 100 µl de la solution d'enzyme à 100 g/l, homogénéiser.
 6.6 Chronométrer le temps d'écoulement des différentes solutions entre les deux traits du viscosimètre exactement 15 minutes après l'ajout d'enzyme.

7. REPRESENTATION GRAPHIQUE DES VALEURS MESUREES

Retrancher du temps d'écoulement la valeur t_0 correspondant au tampon à pH 3,5 seul. Etablir le graphique représentant le logarithme temps d'écoulement en fonction de la concentration de l'enzyme.
 Il doit exister au moins trois points alignés correspondant aux dilutions les plus fortes. Si ce n'est pas le cas, utiliser une solution d'enzyme plus diluée par exemple à 50 g/l ou même 10 g/l.

8. INTERPRETATION DES RESULTATS

Rechercher l'équation de la droite de régression passant par les trois points alignés :
 $T = a.x + b$
 En déduire la concentration nécessaire d'enzyme C pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié $(T_p - t_0)/2$ soit $T_{0,5}$.

9. EXEMPLES

9.1 Détermination de la concentration nécessaire d'enzyme pour que la viscosité de la solution de pectine diminue de moitié. (Tableau 1)
 Temps d'écoulement du tampon seul $t_0 = 19,3$ s

Tableau 1 :

Vol (µl) d'enzyme à 100g/l /50 ml de pectine	Concentration (g/l)	Temps écoulement (s)	Temps corrigé (s)	Log. Temps corrigé
0	0	230 (T_p)	210,7 ($T_p - t_0$)	2,32
5	0,01	190	170,7	2,23
25	0,05	107	87,7	1,94
100	0,2	32,8	13,5	1,13
500	1	23,8	4,5	0,65*

Temps corrigé = temps d'écoulement – temps d'écoulement du tampon à pH 3,5

* valeur non prise en compte

équation de la droite de régression (fig.1) $y = -5,8366 + 2,2844$

$(T_p - t_0) / 2 = 105$ s.

$\text{Log } 105 = 2,02 \rightarrow C = (2,28 - 2,02) / 5,84 = 0,044$

Donc il faut 0,044 g/l d'enzyme pour diminuer de moitié la viscosité d'une solution de pectine de pomme à 10 g/l à 30 °C durant 15 minutes.

On constate que 1 g/l d'enzyme a permis de réduire pratiquement totalement la viscosité de la solution de pectine en 15 minutes.

*Exemplaire certifié conforme
 Zagreb, le 3 juillet 2009
 Le Directeur Général de l'OIV
 Secrétaire de l'Assemblée Générale*

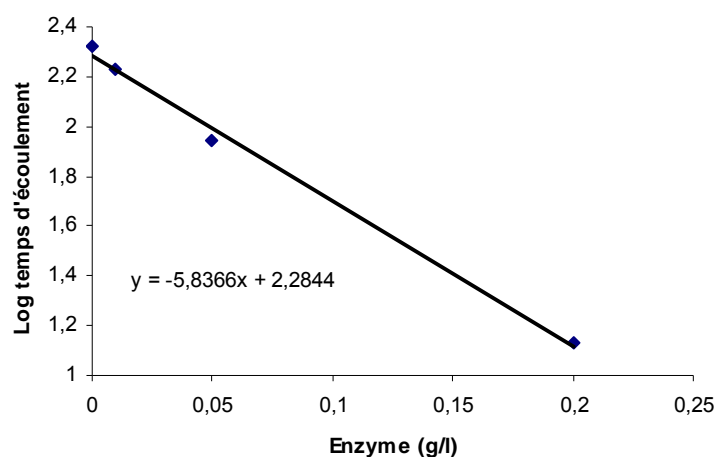


Fig.1 Diminution de la viscosité d'une solution de pectine en fonction de la concentration en enzyme.

9.2 Réduction de la viscosité d'une solution de pectine à 10 g/l en fonction du temps de réaction à 30 °C d'une enzyme à la concentration de 0,1 g/l. (fig. 2) - *A titre d'information*

Le temps d'écoulement du tampon est de 19,6 s.

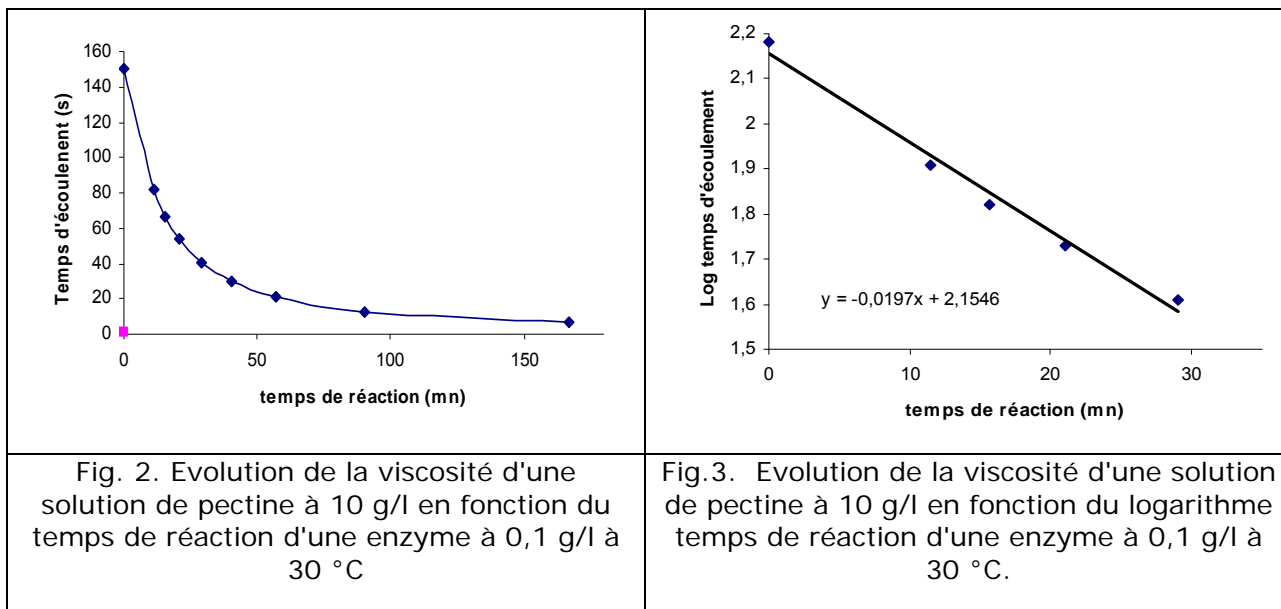
Tableau 2 :

Temps de réaction (mn)	Temps d'écoulement (s)	Temps d'écoulement corrigé* (s)	Log du temps d'écoulement
0	170 (T_p)	150,7 ($T_p - t_0$)	2,18
11,5	101,4	82,1	1,91
15,6	86	66,7	1,82
21,08	72,8	53,5	1,73
29	59,83	40,53	1,61
40,31	48,79	29,49	1,47
57	40,08	20,78	1,32
90	32,25**	12,95	1,11
167	26,25**	6,95	0,84

* Temps d'écoulement corrigé

**valeurs non prises en compte, la quantité de pectine restante limitant la réaction.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



Interprétation des résultats

Les valeurs du tableau 2 montrent qu'il faut une durée de réaction $T/2$ de 13,3 minutes pour réduire la viscosité de la solution de pectine à 10 g/l de moitié à 30 °C.

Par le calcul, à partir de la droite de régression de la fig. 3 :

$$\text{Log}75,35 = 1,877$$

$$\text{d'où } T_{0/2} = (2,1545 - 1,877) / 0,0197 = 14,1 \text{ minutes.}$$

10. BIBLIOGRAPHIE

Bertrand A. détermination de la capacité d'une préparation enzymatique de type polygalacturonase à couper les chaînes pectiques par la mesure de la viscosité OIV FV 1260

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 352/2009

METHODE DE DIFFÉRENCIATION DES TANINS OENOLOGIQUES COMMERCIAUX – MODIFICATION DE LA MONOGRAPHIE

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

Vu l'article 2, paragraphe 2 iii de l'Accord portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Après avoir étudié la recherche réalisée par la sous-commission "Méthodes d'analyse" et le groupe d'experts "Spécification des produits oenologiques",

Considérant la résolution Oeno 12/2002 concernant la monographie sur les tanins oenologiques,

DÉCIDE, sur proposition de la Commission II "Oenologie", de modifier la monographie existante et de la compléter par l'addition d'une annexe relative à la méthode suivante.

DIFFÉRENCIATION DES TANINS OENOLOGIQUES COMMERCIAUX PAR ANALYSE CG/SM DES MONOSACCHARIDES ET DES POLYOLS

1. Introduction

Selon le codex oenologique international de l'O.I.V., les tanins oenologiques devraient être extraits de noix de galle (*de Quercus*, tels que galles d'Alep), de Tara, également appelé *Caesalpina Spinosa*, du bois de chêne (*quercus* sp.), de pépins et pellicules de raisin (*Vitis vinifera*) et du bois de certains arbres tels que le quebracho (*Schinopsis balansae*) et le châtaignier (*Castanea* sp.).

2. Domaine d'application

La méthode décrite permet de différencier des tanins oenologiques commerciaux de différentes origines (galles végétales, pépins et pellicules de raisin, bois de chêne, de châtaignier et de quebracho).

3. Principe

La concentration de monosaccharides (arabinose, xylose, fructose et glucose) et de polyols (arabitol, quercitol, pinitol, chiroinositol, mucoinositol, scylloinositol et mesoinositol) dans des échantillons de tanin a été déterminée par couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse (CGSM) après leur dérivatisation préalable en triméthylsilyléthers.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

4. Réactif et produits

Réactifs

- Triméthylsilylimidazole (TMSI) pur à 97 %
- Triméthylchlorosilane (TMCS)
- Pyridine anhydre, pure à 99,5 %
- Eau de grande pureté issue d'un système Milli-Q A10

Étalons

Phényle- β -glucoside (étalon interne) : 1 mg.mL⁻¹ préparé dans du méthanol à 70 %

Préparation des solutions étalons (de monosaccharides et de polyols)

Les solutions étalons de glucose, fructose, arabinose, xylose, arabitol, pinitol, myoinositol, scylloinositol, mucosinose et chiroinositol ont été dissoutes dans un mélange méthanol : eau (30:70) à des concentrations variant entre 0,05 et 0,5 mg/mL de chaque étalon. Étant donné que le quercitol et le bornesitol ne sont pas disponibles dans le commerce, des extraits aqueux ont été préparés à partir de glands de chêne *Quercus sp.* et de feuilles d'*Echium vulgare*. Les extraits ont été concentrés par évaporation sous vide à basse température, silylés, puis injectés comme indiqué ci-dessous. La teneur en hydrates de carbone (triple détermination, RSD \leq 5 %) est de 68 % de quercitol, 20 % de glucose et 18 % de fructose pour l'extrait de chêne, et 20 % de fructose, 33 % de glucose, 27 % de bornesitol, 2 % de mesoinositol et 19 % de saccharose pour l'extrait d'*Echium*.

Remarque : Les solutions étalons doivent de préférence être préparées chaque jour et conservées dans un réfrigérateur avant injection. Les échantillons doivent être dérivatisés et analysés dans la même journée.

5. Échantillons

Vingt-huit échantillons de différents tanins commerciaux, parmi lesquels des tanins de bois de chêne (O ; n=4), pépin de raisin (S ; n=6), pellicule de raisin (H ; n=2), galls végétales (G ; n=6), châtaignier (ch ; n=3), quebracho (Q ; n=3), gambier (GMB ; n=1) et mélanges de raisin+quebracho (GQ ; n=1), quebracho+châtaignier+galle végétale (QChG ; n=1) et châtaignier+quebracho (ChQ ; n=1), ont été achetés directement sur le marché ou fournis par des fabricants.

6. Appareillage

- Hotte de laboratoire
- Verrerie de laboratoire : béchers, récipients, etc.
- Micropipettes
- Évaporateur rotatif
- Vortex
- Broyeur
- Centrifugeuse

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

- Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF) - Chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à spectrométrie de masse opérant en mode impact électronique à 70 eV. Les données MS sont enregistrées de 40 à 700 m/z.
- colonne en silice fondue de 25 m X 0,25 mm de diamètre intérieur X 0,25 d'épaisseur de film, enduite de méthylsilicone réticulé.

7. Mode opératoire

Procédure de dérivation

50 mg de tanins sont dissous dans 5 mL d'eau désionisée et filtrée à l'aide d'un papier filtre Whatman n° 1 ou équivalent. L'étalon interne est obtenu en mélangeant 1 mL d'échantillon et 1 mL de phényle- β -glucoside. Le mélange est concentré par évaporation sous vide et des dérivés triméthylsilylés sont obtenus par ajout de 100 μ L de pyridine anhydre, 100 μ L de TMSI et de 100 μ L de TMCS, en agitant après chaque ajout. L'extraction des dérivés triméthylsilylés (TMS) est effectuée avec 100 μ L d'hexane et 200 μ L d'eau..

Analyse par chromatographie gazeuse

1 μ L de la couche supérieure d'hexane est injecté sur le chromatographe en phase gazeuse. L'identité de chaque composé est confirmée par comparaison de leurs temps de rétention et spectres de masse, obtenus par CGSM, avec ceux des étalons. Le profil chromatographique type de chaque origine de tanin est illustré en Figure 1.

Analyse par CG-DIF. - conditions chromatographiques

-

Les injections sont faites en mode "splitless" Température de l'injecteur et du détecteur : 300 °C. La température du four est maintenue à 100 °C pendant 1 minute, programmée à 200 °C moyennant une vitesse de chauffage de 30 °C.min⁻¹ et maintenue pendant 15 minutes, et finalement programmée à 270 °C à 15 °C min⁻¹ et maintenue pendant 20 minutes. Le gaz vecteur est l'azote..

Analyse CGSM. conditions chromatographiques - Chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur de masse quadripolaire (HP 6890 ou similaire) fonctionnant en mode impact électronique (IE) à 70 eV. Les données SM ont été enregistrées de 40 à 700 m/z.

- Conditions chromatographiques :

Les injections sont faites en mode splitless. L'injecteur est à 300 °C et la température du four est maintenue à 100 °C pendant 1 minute, puis programmée à 200 °C moyennant une vitesse de chauffage de 30 °C min⁻¹ et maintenue pendant 15 minutes, et finalement programmée à 270 °C à

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

15 °C min⁻¹ et maintenue pendant 20 minutes. Le gaz vecteur est de l'hélium à 1 mL min⁻¹.

8. Calcul (Résultats)

L'analyse quantitative est effectuée à l'aide du facteur de réponse (FR) de chaque étalon par rapport au phényle- β -D-glucoside (étalon interne) sur la plage attendue. La reproductibilité de la méthode est évaluée par analyse d'un échantillon sur cinq jours différents. Néanmoins, cette méthode ne permet pas de distinguer les tanins de quebracho des tanins de pellicule de raisins. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) (Tableaux 1 et 2) sont calculées pour chaque composé selon la méthode de Foley et Dorsey (1984). Des valeurs moyennes de 0,42 ng et 1,41 ng injectés ont été respectivement obtenues pour la LD et la LQ. Les concentrations des polyols et des monosaccharides dans les tanins analysés sont présentées respectivement dans les tableaux 3 et 4.

Cette méthode permet de classifier les tanins selon le schéma proposé en Figure 2. Le quercitol révèle la présence de tanins de bois de chêne, tandis que le pinitol est principalement un indicateur de tanins issus de galles de tara et le bornesitol de tanins du gambier. L'absence d'arabinose et de xylose dans les tanins de galles peut également aider à la caractérisation de ces échantillons. Par conséquent, le bornesitol, le quercitol, le pinitol, l'arabinose et le xylose pourraient être utilisés pour différencier ces produits avec certitude, et pour distinguer en outre ces tanins du reste des produits analysés. Les tanins de galles et de raisin peuvent être facilement différenciés de ceux d'autres origines en raison de l'absence d'arabinose et de xylose dans leur composition en monosaccharide. En ce qui concerne les échantillons de tanin de raisin, du fructose a pu être observé dans les tanins de pépins de raisin, mais pas les tanins de pellicule de raisin. La présence de mucinositol et de chiroinositol pourrait être utile pour distinguer les tanins de châtaignier de ceux du quebracho ou de pellicule de raisin.

9. Bibliographie

Carlavilla, C., Villamiel, M., Martínez-Castro, I., Moreno-Arribas, M.V. Occurrence and significance of quercitol and other inositols in wines during oak wood aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 468-473

Foley, J.P.; Dorsey, J.G. Clarification of the limit of detection in chromatography. *Chromatographia*, **1984**, *18*, 503-511

Sanz L., Martínez-Castro I., Moreno-Arribas, M.V. Identification of the origin of commercial enological tannins by the analysis of monosaccharides and polyalcohols. *Food Chem.*, **2008**, *111*, 778-783

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Tableau 1. Répétabilité de la méthode de chromatographie gazeuse pour la détermination des hydrates de carbone dans les tanins (échantillon Q3).

	Valeur moyenne	Écart type
Xylose	0,17	0,01
Arabinose	0,43	0,03
Arabitol	0,04	0,00
Quercitol	0,00	0,00
Fructose	0,32	0,04
Glucose	0,60	0,02
Mucoinositol	0,02	0,00
Chiroinositol	0,00	0,00
Scylloinositol	0,00	0,00
Mesoinositol	0,05	0,00

Tableau 2. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de la méthode de détermination des hydrates de carbone et polyols dans les échantillons de tanins œnologiques par chromatographie gazeuse (exprimées en ng injectés)

	LD (ng)	LQ (ng)
Xylose	0,50	1,66
Arabinose	0,66	2,21
Arabitol	0,21	0,70
Fructose	1,11	3,70
Glucose	0,51	1,70
Mucoinositol	0,16	0,52
Chiroinositol	0,22	0,74
Scylloinositol	0,20	0,68
Mesoinositol	0,24	0,80

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

1 **Tableau 3.** Concentration des polyols (mg/100g), tr=traces dans les tanins commerciaux

		mg/100g							
		Arabitol	Quercitol	Pinitol	Bornesitol	Mucoinositol	Chiroinositol	Scylloinositol	Mesoinositol
Bois de chêne	O1	0.06	6.92	-	-	0.10	0.10	0.52	0.49
	O2	0.06	4.49	-	-	0.11	0.11	0.57	0.55
	O3	0.05	1.57	-	-	0.04	0.02	0.13	0.12
	O4	0.09	3.14	-	-	0.14	0.17	0.17	0.30
Galles végétales	G1	-	-	0.73	-	-	-	-	-
	G2	-	-	0.26	-	-	-	-	tr*
	G3	-	0.03	0.07	-	-	-	0.03	tr
	G4	-	0.06	0.06	-	-	-	0.04	-
	G5	-	-	1.35	-	-	-	-	0.02
	G6	-	-	-	-	-	-	-	-
Pépin de raisin	S1	-	-	-	-	-	-	tr	0.16
	S2	-	-	-	-	-	-	tr	0.01
	S3	-	-	-	-	-	-	0.38	2.34
	S4	-	-	-	-	-	-	tr	0.01
	S5	-	-	-	-	-	-	-	0.01
	S6	0.64	-	-	-	-	-	tr	0.25
Pellicule de raisin	H1	-	-	-	-	-	-	-	-
	H2	-	-	-	-	-	-	-	tr
Châtaignier	Ch1	0.08	-	-	-	0.14	0.55	-	0.62
	Ch2	0.04	-	0.49	-	0.03	0.33	-	0.05
	Ch3	0.07	-	-	-	0.19	0.52	-	0.49
Quebracho	Q1	tr	-	-	-	-	-	-	0.01
	Q2	0.02	0.05	0.09	-	-	-	-	tr
	Q3	0.03	-	-	-	0.02	-	-	0.05
Gambier	GMB	0.01	-	tr	0.02	-	-	-	0.03
Raisin+quebracho	GQ	0.10	-	0.19	-	0.02	0.06	-	0.07
Quebracho+Châtaignier+galle	QChG	0.03	-	0.19	-	0.03	0.12	-	0.12
Châtaignier+quebracho	ChQ	0.05	-	-	-	0.13	0.56	-	0.53

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de
l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée
Générale*

Tableau 4. Concentration des monosaccharides (mg/100g) dans les tanins commerciaux

		mg/100g			
		Xylose	Arabinose	Fructose	Glucose
Bois de chêne	O1	0.29	1.18	-	0.22
	O2	0.57	2.53	-	0.07
	O3	0.37	0.85	0.12	0.58
	O4	0.41	1.84	1.82	2.69
Galles végétales	G1	-	-	0.26	0.42
	G2	-	-	0.07	0.17
	G3	-	-	0.05	0.05
	G4	-	-	0.11	0.16
	G5	-	-	0.50	0.63
	G6	-	-	-	-
Pépin de raisin	S1	-	-	10.01	9.59
	S2	-	-	0.64	0.50
	S3	-	-	45.23	32.46
	S4	-	-	0.61	0.46
	S5	0.13	-	-	0.03
	S6	-	-	1.22	tr
Pellicule de raisin	H1	-	-	-	0.07
	H2	0.31	0.48	0.30	0.67
Châtaignier	Ch1	0.50	1.46	1.15	0.78
	Ch2	0.41	1.04	0.95	0.91
	Ch3	0.65	1.55	0.28	0.69
Quebracho	Q1	0.30	0.44	0.22	0.20
	Q2	0.07	0.10	0.05	0.10
	Q3	0.16	0.42	0.32	0.59
Gambier	GMB	0.02	-	0.42	0.12
Raisin+quebracho	GQ	0.07	0.11	0.25	0.28
Quebracho+ Châtaignier +galle	QChG	0.04	0.07	0.17	0.30
Châtaignier+quebracho	ChQ	0.29	1.29	1.34	1.46

Tr=traces

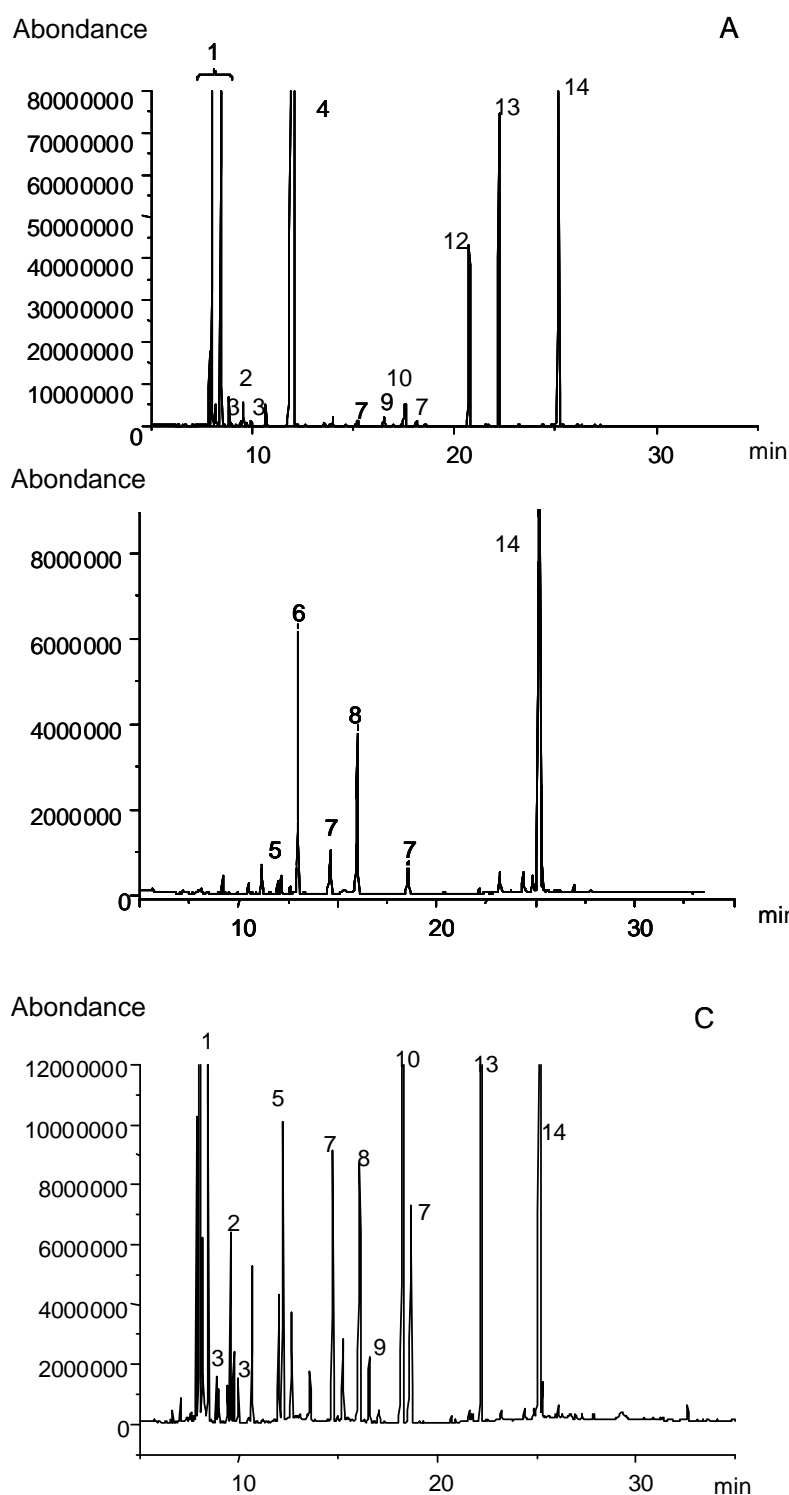
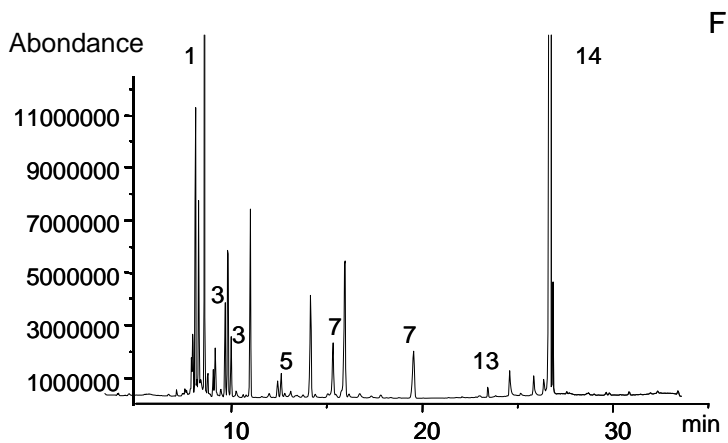
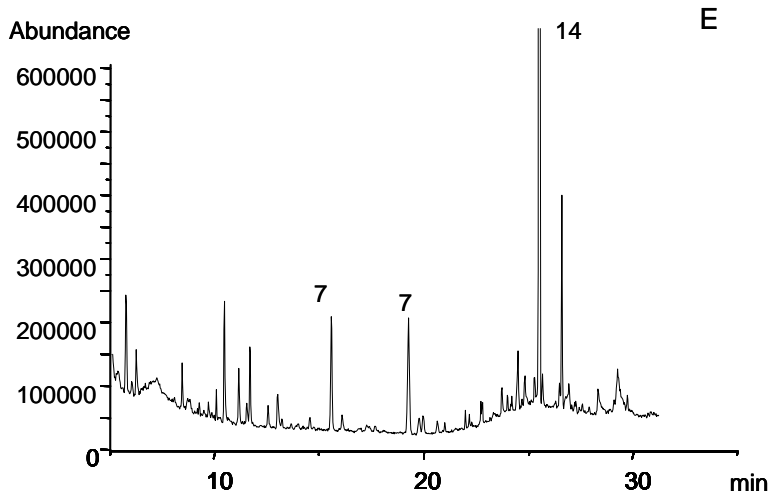
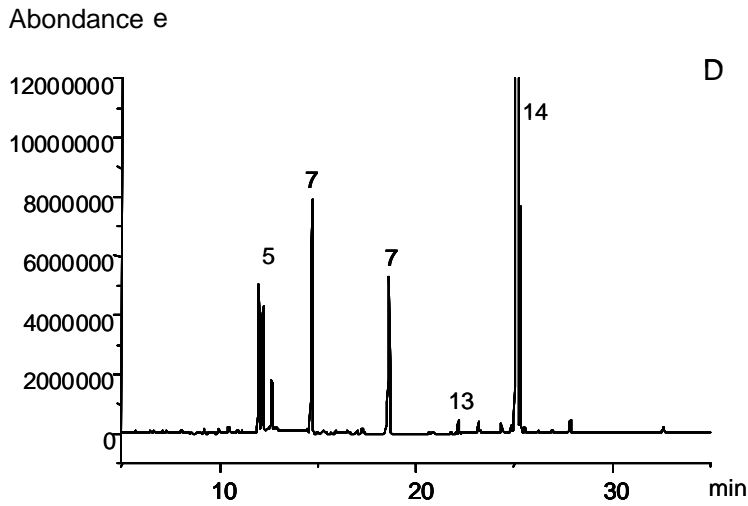


Figure 1. Profils chromatographiques en phase gazeuse des polyols et des hydrates de carbone présents dans des tanins commerciaux de A) bois de chêne, B) galle végétale, C) bois de châtaignier, D) pépin, de raisin, E) pellicule de raisin, F) bois de quebracho, G) gambier. 1-arabinose, 2-arabitol, 3-xylose, 4-quercitol, 5-fructose, 6-pinitol, 7-glucose, 8-acide gallique, 9 Mucoinositol, 10 Chiroinositol, 11-Bornesitol, 12- Scylloinositol, 13- Mesoinositol, 14-Phényle- β -D-glucoside (étalon interne)

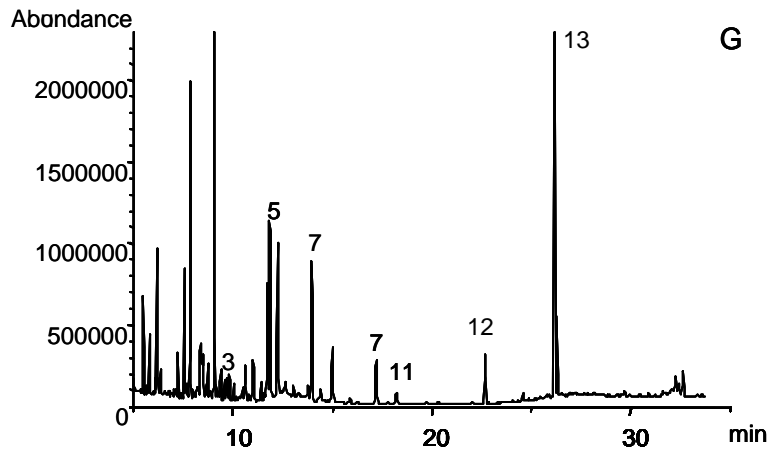
Figure 1. suite



*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

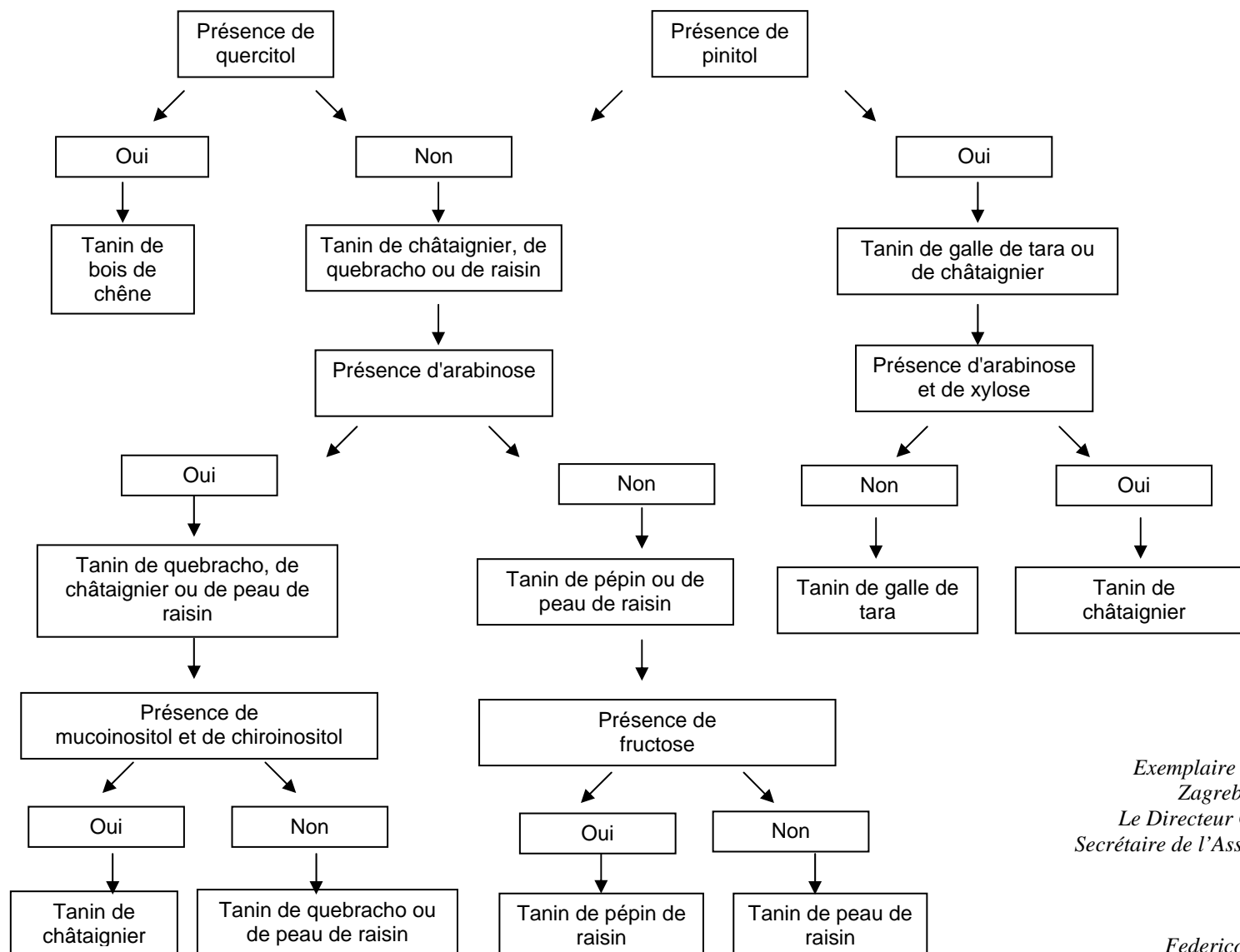
Federico CASTELLUCCI

Figure 1. suite



*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Figure 2. Schéma de classification des tanins en fonction de leur composition en monosaccharides et polyols



RÉSOLUTION OIV/OENO 365/2009

REVISION DE LA MONOGRAPHIE SUR LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES (OENO 14/2003)

L'ASSEMBLEE GENERALE

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin

Ayant pris connaissance des travaux du groupe d'experts « Spécification des produits œnologiques »

Considérant la résolution Oeno 14/2003 adoptée par l'OIV

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », de modifier la résolution Oeno 14/2003 figurant dans le Codex œnologique international par la monographie suivante:

PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Les prescriptions formulées ci-dessous concernent toutes les préparations enzymatiques susceptibles d'être utilisées au cours des diverses opérations que l'on peut appliquer aux raisins et à leurs dérivés.

Elles se basent sur les « General Specifications and Considerations for Enzymes used in Food Processing » émises par le "Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 67th Meeting, Rome 20 – 29 June 2006 et publiées en 2006 dans les Monographies FAO JECFA.

1. GENERALITES

Les préparations enzymatiques peuvent être élaborées à partir de microorganismes ou de végétaux.

Lorsqu'il s'agit de rechercher une synergie entre diverses activités enzymatiques telles que les pectinases, les cellulases et les hémicellulases, des mélanges de préparations issues de souches différentes peuvent être réalisés. Ces préparations peuvent contenir un ou plusieurs composants actifs, ainsi que des supports, des diluants, des agents conservateurs, des antioxydants ou d'autres substances compatibles avec les bonnes pratiques de fabrication et en accord avec la réglementation locale. Elles peuvent dans certains cas contenir des cellules ou des fragments de cellules. En outre, elles peuvent se présenter sous l'aspect liquide ou solide. Les substances actives peuvent également être immobilisées sur des supports admis pour des usages alimentaires. .

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

2. ETIQUETAGE

L'étiquetage des préparations enzymatiques doit préciser au minimum la nature de la préparation (ex. enzyme pectinolytique), l'activité (en unités par g ou ml), le numéro de lot et la date limite d'utilisation. Les préparations enzymatiques à effets technologiques multiples (cf. 4.1) doivent être indiquées comme telles sur l'étiquette (par exemple : Préparation enzymatique à effets clarifiant et révélateur d'arôme).

Si la place à disposition le permet, il serait souhaitable que les informations suivantes figurent également sur l'étiquette : activité principale sur laquelle la préparation a été standardisée, dosage préconisé et conditions de mise en œuvre, conditions de conservation pour le maintien de la stabilité, nature des additifs et des supports utilisés, Si la place fait défaut, ces informations seront alors indiquées sur la fiche technique de la préparation.

L'indication que les préparations enzymatiques ont été obtenues à partir d'organismes génétiquement modifiés, si cela est le cas doit être mentionné.

3. PREPARATIONS ENZYMATIQUES ADMISES

Toutes les préparations enzymatiques contenant des activités présentant un intérêt technologique dûment prouvé dans la pratique et remplissant pleinement les conditions et les critères mentionnés ci-dessous, sont admises pour le traitement des raisins et de leurs dérivés.

Les préparations enzymatiques utilisées ne doivent contenir ni substance, ni micro-organisme ou activité enzymatique pouvant :

- être nuisible à la santé;
- être nuisible à la qualité des produits élaborés;
- conduire à la formation de produits indésirables ;
- occasionner ou faciliter une fraude.

4. ACTIVITES ENZYMATIQUES

4.1 Généralités

Les préparations enzymatiques contiennent souvent plusieurs activités enzymatiques. En dehors des activités enzymatiques principales (activité(s) sur laquelle - respectivement sur lesquelles - la préparation enzymatique est standardisée) dont l'intérêt et l'effet technologiques ont été dûment prouvés, des activités enzymatiques dites secondaires ne sont tolérées que dans les limites des contraintes technologiques de production des préparations enzymatiques. Elles doivent être aussi réduites que possible. Les activités qui ont un effet négatif sur la qualité du vin (ex. cinnamoyl-estérases) ne devraient pas être présentes dans les préparations enzymatiques commercialisées en œnologie. D'une façon générale, les activités secondaires doivent également satisfaire aux exigences formulées ci-dessus, sous le point N° 3

De manière générale, les activités secondaires contenues dans une préparation donnée ne doivent pas devenir la raison principale motivant l'utilisation de ladite préparation, à moins qu'il ne s'agisse d'une préparation à effets technologiques multiples. Au niveau technologique, on différencie, à ce sujet, entre des préparations à effet :

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

- macérant : facilitent l'extraction de composés tels que la couleur, les tanins, ..
- clarifiant : facilitent la clarification et la filtration des moûts et des vins
- révélateur d'arôme : renforce et/ou modifie le profil aromatique des moûts et des vins
- stabilisant : facilite l'extraction de macromolécules ou d'autres substances ayant un effet stabilisant sur les vins (ex. mannanes des levures)

Lorsqu'une préparation enzymatique génère des effets technologiques multiples, dûment constatés dans la pratique, (ex. enzymes clarifiantes **et** révélatrices d'arôme) qu'ils soient la résultante d'activités principales et/ou secondaires, elle doit être déclarée comme telle sur l'étiquette. Les différentes activités responsables de ces effets doivent être dosées et indiquées dans la fiche technique de la préparation.

Les activités sont exprimées en nKat. (nkat = 1 nmole de substrat transformé ou de produit formé par seconde, par g ou ml de préparation).

4.2 Mesure des activités

Les activités enzymatiques présentes sont dosées dans les conditions qui correspondent à leurs caractéristiques biochimiques (pH, température) et si possible le plus proche de celles rencontrées dans la pratique (jus de raisin, moût ou vin). Les méthodes mises en œuvre doivent correspondre à l'état de l'art en matière d'analytique et, si possible, être validées selon des standards internationaux appropriés (par ex. ISO 78-2 ; ISO 5725).

Les résultats sont exprimés en nanokatal/g ou nanokatal/ml.

Dans le cas où l'effet technologique recherché résulterait de l'action de différentes enzymes au sein d'une même préparation, la mesure de chacune de ces activités enzymatiques est nécessaire. Chacune de ces activités fera l'objet de fiches particulières où seront précisées les méthodes de mesure.

5. SOURCES D'ENZYMES ET MILIEUX DE FERMENTATION

Les sources microbiennes d'enzymes doivent être non pathogènes, non toxigènes et génétiquement stables. En outre, les milieux de fermentation ne doivent pas laisser de résidus nuisibles à la santé dans les préparations enzymatiques. Dans le cas des micro-organismes, une étude de sécurité doit être réalisée afin de s'assurer qu'une préparation enzymatique produite par une espèce donnée de micro-organisme (ex. *Aspergillus niger*) ne présente pas de risque pour la santé. Cette étude peut être effectuée en se basant sur les principes énoncés dans les lignes directrices pour les enzymes alimentaires publiées par le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH) ou d'autres organismes équivalents. Les techniques mises en œuvre doivent être compatibles avec les bonnes pratiques de fabrication et les prescriptions du Codex œnologique international si des levures et/ou des bactéries lactiques sont utilisées.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

6. SUPPORTS, DILUANTS, AGENTS CONSERVATEURS OU AUTRES ADDITIFS

Les substances utilisées comme supports, diluants, agents conservateurs ou autres additifs ne doivent pas, par effet « carry-over », diffuser dans les raisins et leurs produits dérivés des composés qui ne seraient pas compatibles avec la réglementation en vigueur dans les différents pays. Par ailleurs, ces composés ne doivent pas avoir d'incidence négative sur la qualité et les propriétés organoleptiques du vin.

Dans le cas d'enzymes immobilisées, les supports utilisés doivent répondre aux normes sur les matériaux entrant en contact avec les denrées alimentaires. Pour ce dernier type de préparation, la teneur des composants du support utilisé, susceptibles de passer dans le moût ou le vin, devra être déterminée et indiquée sur l'étiquette de la préparation enzymatique.

Des agents conservateurs tels que le KCl sont ajoutés dans le concentré liquide d'enzymes au cours de la fabrication. Ces substances permettent d'éviter le développement de micro-organismes au cours des différentes opérations de formulation des produits. Elles se retrouvent dès lors non seulement dans les préparations liquides mais également dans les préparations solides. Compte tenu de l'inévitable effet « carry-over », seuls les agents conservateurs qui sont compatibles avec la réglementation en vigueur dans les différents pays sont autorisés. Ces substances doivent être clairement identifiées et indiquées sur l'étiquette ou sur la fiche technique du produit commercial.

7. HYGIENE ET TENEURS LIMITEES EN CONTAMINANTS

Les préparations enzymatiques doivent être produites en accord avec les bonnes pratiques de fabrication.

7.1 Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur inférieure à 5 mg/kg.

7.2 Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur inférieure à 0,5 mg/kg.

7.3 Arsenic

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur inférieure à 3 mg/kg.

7.4. Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur inférieure à 0,5 mg/kg

7.5 Salmonelles sp

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

7.6 Coliformes totaux

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Teneur inférieure à 30 par gramme de préparation.

7.7 *Escherichia coli*

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

7.8 ACTIVITE ANTIMICROBIENNE :

non détectable

7.9 MYCOTOXINES SPECIFIQUES AUX DIVERSES SOUCHES DE PRODUCTION :

non détectables

8 . FICHE TECHNIQUE A FOURNIR OBLIGATOIREMENT PAR LE FABRICANT

Chaque sorte de préparation enzymatique doit être définie à l'aide d'une fiche technique.

Celle-ci doit contenir au minimum les informations suivantes :

- Nom de l'enzyme et origine biologique (par exemple enzyme pectolytique de *Aspergillus niger* ou enzyme pectolytique de *A. oryzae* exprimée dans *A. niger*);
- Activité déclarée (en nKat/g ou nKat/ml de préparation)

- Domaines et modalités d'application (effets technologiques attendus et détails utiles à la mise en oeuvre de la préparation);
- Stabilité de la préparation avec période limite d'utilisation à partir de la date de production, garantissant le maintien de l'activité, sous des conditions de stockage données (température, ...)

- Types de réactions catalysées par les activités enzymatiques principales;
- Activités enzymatiques principales avec N° IUB (par exemple Tannase 3.1.1.20);
- Activités enzymatiques secondaires avec, si possible, le N° IUB
- Types de supports, de diluants, d'agents conservateurs ou d'additifs utilisés, ainsi que leurs teneurs ;

Si jugé utile, d'autres informations peuvent compléter cette fiche technique.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 366/2009

MONOGRAPHIE SUR LES CARBOXYMETHYLCELLULOSE (GOMMES DE CELLULOSE)

L'ASSEMBLEE GENERALE

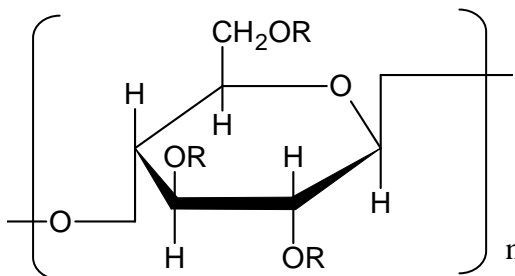
Vu l'Article 2, paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Vu la résolution 2/2008 adoptée par l'OIV en 2008 relative à l'addition de carboxyméthylcellulose aux vins blancs et aux vins mousseux afin de contribuer à leur stabilisation tartrique

Sur proposition du groupe d'experts « Spécifications des produits œnologiques »

DECIDE de compléter le Codex Oenologique international par la monographie suivante :

CARBOXYMETHYLCELLULOSE
(Gomme de cellulose)
(CMC)
N° SIN 466
CAS [9004-32-4]



où R = H ou CH₂COONa

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La carboxyméthylcellulose à usage œnologique est préparée uniquement à partir de bois par traitement avec de la soude et de l'acide monochloroacétique ou son sel de sodium.

La carboxyméthylcellulose inhibe la précipitation tartrique par effet "colloïde protecteur". Sa dose d'utilisation est limitée.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

2. SYNONYMES

Carboxyméthylcellulose
CMC
CMC sodique
Gomme cellulosique.
Sel de sodium de la carboxyméthyl éther de cellulose
NaCMC

3. ETIQUETAGE

L'étiquetage doit mentionner que la carboxyméthylcellulose est à usage alimentaire, les conditions de sécurité et de conservation.

4. CARACTERES

4.1 Description

Poudre granuleuse ou fibreuse, blanche ou légèrement jaunâtre ou grisâtre, légèrement hygroscopique, inodore et insipide.

Elle peut être proposée sous forme de solution à diluer dans du vin avant utilisation. Les solutions doivent contenir au moins 3,5% de carboxyméthylcellulose.

4.2 Formule chimique

Les polymères contiennent des unités d'anhydroglucoses substitués avec la formule générale suivante :

$[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_2COONa)_y]_n$ où

n est le degré de polymérisation

x = de 1,50 à 2,80

y = de 0,2 à 1,50

x + y = 3,0

(y = degré de substitution)

Note : Seules les carboxyméthylcelluloses dont le degré de substitution est compris entre 0,6 et 1,0 sont complètement solubles.

4.3 Degré de substitution

Evaluer le degré de substitution avec la méthode décrite ci-dessous.

Le degré de substitution doit être compris entre 0,60 et 0,95.

4.4 Poids moléculaire

Compris entre 17 000 et 300 000 (degré de polymérisation allant de 80 à 1 500)

Le poids moléculaire peut être évalué par la mesure de la viscosité.

La viscosité d'une solution à 1% doit être comprise entre 10 et 15 mPa.s⁻¹, ou entre 20 et 45 mPa.s⁻¹ pour une solution à 2%, ou entre 200 et 500 mPa. s⁻¹ pour une solution à 4%.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

4.5 Composition

Mesurer la composition en carboxyméthylméthylcellulose selon la méthode décrite ci-dessous.

La teneur en carboxyméthylcellulose doit au moins être de 99,5 % de la substance anhydre.

5. ESSAIS

5.1 Solubilité

Produit une solution colloïdale visqueuse avec de l'eau.

Insoluble dans l'éthanol.

5.2 Test de la mousse

Une solution à 0,1 % de l'échantillon est secouée vigoureusement.

Aucune couche de mousse n'apparaît (ce test permet de distinguer la carboxyméthylcellulose sodique des autres éthers de cellulose et des produits des alginales et les gommes naturelles).

5.3 Formation d'un précipité

À 5 mL d'une solution à 0,5 % de l'échantillon ajouter 5 mL d'une solution à 5 % de sulfate de cuivre ou de sulfate d'aluminium. Un précipité apparaît (ce test permet de distinguer la carboxyméthylcellulose sodique des autres éthers de cellulose ainsi que de la gélatine, de la farine de graines de caroube et de la gomme adragante).

5.4 Réaction colorée

Ajouter 0,5 g de carboxyméthylcellulose sodique en poudre à 50 mL d'eau en remuant pour provoquer une dispersion uniforme. Continuer à remuer jusqu'à obtention d'une solution claire, puis l'utiliser pour effectuer le test suivant : à 1 mg d'échantillon dilué dans un même volume d'eau dans un petit tube à essais ajouter 5 gouttes d'une solution de 1-naphtol. Incliner le tube à essais et introduire prudemment le long du tube 2 mL d'acide sulfurique de manière à ce qu'il forme une couche inférieure. Une couleur rouge pourpre apparaît à l'interface.

5.5 Humidité - Perte par séchage

Mesurer la perte par séchage selon la méthode décrite ci-dessous.

La perte par séchage doit être inférieure à 12%.

5.6 pH d'une solution à 1 %

Pas moins de 6 et pas plus de 8,5 unités pH.

5.7 Arsenic

Doser l'arsenic selon la méthode décrite au chapitre II.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg

5.8 Plomb

Doser le plomb selon la méthode décrite au chapitre II.

La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.9 Mercure

Doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II.
La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg

5.10 Cadmium

Doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II.
La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg

5.11 Glycolate libre

Doser le glycolate selon la méthode décrite ci-dessous.
La carboxyméthylcellulose ne doit pas contenir plus de 0,4 % (calculé en glycolate de sodium sur la substance anhydre).

5.12 Sodium

Doser le sodium selon la méthode décrite au chapitre II.
La teneur en sodium doit être inférieure à 12,4 % de la substance anhydre

5.13 Chlorure de sodium

Doser le chlorure de sodium selon la méthode décrite ci-dessous.
La carboxyméthylcellulose ne doit pas contenir plus de 0,5 % de la substance anhydre.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexes

5.14 Perte par séchage

5.14.1 Objectif

Ce test détermine la partie volatile de la carboxyméthylcellulose.

Le résultat de cet essai est utilisé pour calculer les solides totaux de l'échantillon et par extension, toutes les substances volatiles à la température de l'essai sont considérées comme humidité.

5.14.2 Intérêt et utilisation

La mesure du taux d'humidité (en tenant compte de la pureté) est utilisée pour mesurer la quantité de carboxyméthylcellulose dans les produits mis à la vente.

5.14.3 Matériel

5.14.3.1 Etuve à 105°C ± 3°C ;

5.14.3.2 Pèse- filtre de 50 mm de diamètre interne et 30 mm de haut ou équivalent ;

5.14.3.2 Balance de précision

5.14.4 Essai

5.14.4.1 Peser entre 3 et 5 g d'échantillon à ± 1 mg, dans un pèse-filtre préalablement taré.

5.14.4.2 Placer le pèse-filtre sans son couvercle dans l'étuve pendant quatre heures. Laisser refroidir dans un dessiccateur, replacer le couvercle et peser.

5.14.4.3 Continuer le processus jusqu'à poids constant.

5.14.5 Calcul

5.14.5.1 Calculer le pourcentage du taux d'humidité M selon la formule :

$$M = (A/B) \times 100 \text{ où}$$

A = perte de poids par séchage (en g) ;

B = masse initiale d'échantillon.

5.15 Glycolate de sodium

5.15.1. Objectif

Ce test permet la quantification du glycolate de sodium contenu dans la carboxyméthylcellulose purifiée contenant pas plus de 2% de glycolate de sodium.

5.15.2 Résumé de la méthode d'essai

La carboxyméthyl cellulose est dissoute dans de l'acide acétique (50%), précipitée avec de l'acétone en présence de chlorure de sodium et l'insoluble éliminé par filtration. Le filtrat contenant le glycolate de sodium (sous forme d'acide glycolique) est traité pour éliminer l'acétone et réagit avec le 2,7-dihydroxynaphtalène. La couleur résultante est mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre calibré à l'aide de solutions de concentrations connues.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.15.3 Intérêt et utilisation

Cette méthode d'essai (avec celles concernant l'humidité et le chlorure de sodium) est utilisée pour mesurer la quantité de polymère dans la substance. Elle doit être utilisée pour la vérification de la pureté des carboxyméthylcelluloses imposée par les réglementations des autorités sanitaires.

5.15.4 Matériel

- 5.15.4.1 Spectrophotomètre utilisable pour réaliser une analyse à 540 nm ;
- 5.15.4.2 Cellules pour spectrophotomètre de 1 cm de trajet optique
- 5.15.4.3 Papier d'aluminium en carrés d'environ 50 × 50 mm ;
- 5.15.4.4 Balance de précision

5.15.5 Réactifs

- 5.15.5.1 Acide acétique, glacial (pureté ≥ 99%) ;
- 5.15.5.2 Acétone (pureté ≥ 99%) ;
- 5.15.5.3 Solution de 2,7-dihydroxynaphtalène (0,100 g/L) : dissoudre 100 mg ± 1 mg de 2,7-dihydroxynaphtalène (naphtalenediol) dans 1L d'acide sulfurique. Avant utilisation, laisser reposer la solution jusqu'à disparition de la coloration initiale jaune. Si la solution est sombre, l'éliminer et en préparer une nouvelle avec un lot différent d'acide sulfurique. Cette solution est stable un mois quand elle est stockées dans un flacon en verre brun ;
- 5.15.5.4 Solution étalon d'acide glycolique à 1 mg/mL : faire sécher plusieurs grammes d'acide glycolique dans un dessiccateur au moins seize heures à température ambiante. Peser 100 mg ± 1 mg , verser dans une fiole jaugée de 100 mL, dissoudre avec de l'eau, ajuster au trait de jauge avec de l'eau. Ne pas conserver la solution plus de 30 jours ;
- 5.15.5.5 Chlorure de sodium (NaCl, pureté ≥ 99%) ;
- 5.15.5.6 Acide sulfurique concentré (H₂SO₄ pureté ≥ 98%, ρ ≥ 1,84).

5.15.6 Préparation de la droite d'étalonnage

- 5.15.6.1 Dans une série de cinq fioles jaugées de 100 mL, verser 0, 1, 2, 3 et 4 mL de la solution de référence d'acide glycolique (à 1 mg/mL). Dans chaque ballon, ajouter 5 mL d'eau, puis 5 mL d'acide acétique glacial, compléter au trait de jauge avec de l'acétone et mélanger. Ces fioles contiennent respectivement, 0, 1, 2, 3 et 4 mg d'acide glycolique.
- 5.15.6.2 Pipeter 2 mL de chaque solution et les transférer dans cinq fioles jaugées de 25 mL. Evaporer l'acétone en chauffant les fioles non fermées, disposées verticalement dans un bain marie pendant exactement 20 min. Enlever du bain marie et laisser refroidir à température ambiante.
- 5.15.6.3 Ajouter 5 mL de solution de 2,7-dihydroxynaphtalène à 0,100 g/L, bien mélanger, puis de nouveau ajouter 15 mL de solution de 2,7-dihydroxynaphtalène supplémentaires et mélanger. Couvrir les fioles avec un petit morceau de feuille d'aluminium, placer les fioles bien droites dans le bain marie pendant 20 min. Enlever du bain marie, laisser refroidir à température ambiante et compléter au trait de jauge avec de l'acide sulfurique.
- 5.15.6.4 Mesurer l'absorbance à 540 nm de chaque échantillon contre le blanc en utilisant des cellules de 1 cm de trajet optique. Tracer la courbe d'absorbance en fonction de la quantité correspondante d'acide glycolique (en mg) de chaque fiole.

5.15.7 Méthode d'essai

- 5.15.7.1 Peser 0,500 g ± 0,001 g d'échantillon et le transférer dans un bécher de 100 mL. Imbiber entièrement l'échantillon avec 5 mL d'acide acétique, suivi de 5 mL d'eau, mélanger

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

avec une baguette de verre jusqu'à ce que la dissolution soit complète (15 minutes environ sont généralement nécessaires). Ajouter, lentement, 50 mL d'acétone en remuant, puis environ 1 g de sulfate de sodium. Continuer de remuer pendant plusieurs minutes, afin de précipiter complètement la carboxyméthylcellulose.

5.15.7.2 Filtrer à l'aide d'un filtre en papier, préalablement imbibé avec une petite quantité d'acétone et recueillir le filtrat dans une fiole jaugée de 100 mL. Utiliser 30 mL d'acétone pour faciliter le transfert de matières solides et pour laver le résidu de filtration. Compléter au trait de jauge avec de l'acétone et mélanger.

5.15.7.3 Dans une autre fiole jaugée de 100 mL, préparer un blanc avec 5 mL d'eau, 5 mL d'acide acétique glacial, puis compléter au trait de jauge avec de l'acétone et mélanger.

5.15.7.4 Pipeter 2 mL de la solution d'échantillon et 2 mL de la solution de blanc et les verser dans deux fioles jaugées de 25 mL. Évaporer l'acétone comme précédemment (5.15.6.2).

5.15.7.5 Mesurer l'absorbance de l'échantillon et extrapoler la quantité d'acide glycolique (en mg) à l'aide de la courbe de calibration (5.15.6.4).

5.15.8 Calcul : calculer la teneur C (en %) de glycolate de sodium (glycolate libre) contenu selon la formule :

$$C(\% \text{ sodium glycolate}) = \frac{B \times 0.129}{W \times (100 - M)}$$

où

B = acide glycolique (en mg) extrapolé de la courbe de calibration ;

W = quantité de carboxyméthylcellulose pesée (en g) ;

M = taux d'humidité de l'échantillon (en %) ;

0,129 = (rapport du poids moléculaire du glycolate de sodium par rapport au poids moléculaire de l'acide glycolique) / 10.

Note : si l'essai est fait avec une carboxyméthylcellulose préalablement déshydratée, la formule devient :

$$C(\% \text{ sodium glycolate}) = \frac{B \times 0.129}{W}$$

W = quantité de carboxyméthylcellulose (sèche) pesée (en g).

5.16 Chlorure de sodium

5.16.1 Objectif

Cette méthode d'essai concerne la détermination de la teneur en chlorure de sodium de la carboxyméthylcellulose purifiée (> 98%).

5.16.2 Résumé de la méthode d'essai

La carboxyméthylcellulose de sodium est dissoute dans l'eau et titrée par potentiométrie avec une solution de nitrate d'argent. Le peroxyde d'hydrogène est ajouté pour réduire la viscosité de la solution.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.16.3 Importance et utilisation

Cette méthode d'essai (avec l'humidité et de la teneur en glycolate de sodium) est utilisée pour calculer le degré de substitution de la carboxyméthylcellulose. Il doit être utilisé pour analyser les qualités de carboxyméthylcellulose de sodium hautement purifiées (>98%).

5.16.4 Matériel

5.16.4.1 pH-mètre permettant de lire les voltages (en mV), équipé d'une électrode d'argent et d'une électrode de référence au sulfate de mercure I saturée au sulfate de potassium.

5.16.4.2 Burette de 10 ml.

5.16.4.3 Balance de précision.

5.16.4.4 Erlenmeyer de 250 mL.

5.16.5 Réactifs

5.16.5.1 Peroxyde d'hydrogène concentré (30% en m/m) (H₂O₂).

5.16.5.2 Acide nitrique concentré (HNO₃) (ρ 1,42).

5.16.5.3 Nitrate d'argent, solution étalon (0,1 N) - Dissoudre 17,0 g de nitrate d'argent (AgNO₃) dans 1 L d'eau. Conserver dans un flacon en verre ambré. Normaliser la solution comme suit : sécher le chlorure de sodium (NaCl) pendant 2 h à 120°C. Peser 0,65 g ± 0.0001 g, dans un bécher de 250 ml et ajouter 100 ml d'eau. Placer sur un agitateur magnétique, ajouter 10 ml d'HNO₃, et plonger les électrodes du pH-mètre. A l'aide d'une burette, ajouter par fraction de 0,25 mL la quantité théorique de solution de AgNO₃. Après chaque addition, attendre environ 30 secondes avant d'effectuer la lectures des voltages correspondants. En approchant du point final, diminuer les ajouts à 0,05 mL. Enregistrer le voltage (en millivolts) en fonction du volume (en mL) de la solution de titrage, continuer le titrage quelques mL au-delà du point final. Tracer les valeurs de potentiels obtenus, en fonction des volumes de solution titrée correspondants et déterminer le potentiel du point équivalent d'après le point singulier de la courbe obtenue. Calculer la normalité, *N*, comme suit :

$$N = (A \times 1000) / (B \times 58,45)$$

où

A = NaCl utilisé en g,

B = solution ajoutée de AgNO₃ en mL,

58,45 = masse moléculaire du NaCl en g,

5.16.5.4 Chlorure de sodium (NaCl, pureté ≥ 99%).

5.16.6 Méthode d'essai

5.16.6.1 Peser 5 g ± 0.0001 g d'échantillon, dans un bécher de 250 mL. Ajouter 50 mL d'eau et 5 mL de H₂O₂ (30%). Placer le bécher au dessus d'un bain marie, en remuant de temps pour parvenir à une solution fluide. Si la dissolution n'est pas atteinte après 20 min, ajouter 5 mL d'H₂O₂ et chauffer jusqu'à ce que la dissolution soit complète.

5.16.6.2 Refroidir le bécher, ajouter 100 mL d'eau et 10 mL d'HNO₃. Placez-le sur l'agitateur magnétique et titrer avec la solution de AgNO₃ 0,1 N (5.16.5.3) jusqu'au point d'équivalence.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.16.7 Calcul

5.16.7.1 Calculer la teneur en chlorure de sodium, C (en %), comme suit:

$$C = (AN \times 584,5) / [G \times (100 - B)]$$

où :

A = volume de solution de AgNO_3 solution ajoutée (en mL) ;

N = Normalité de la solution de AgNO_3 ;

G = poids d'échantillon utilisé (en g),

B = humidité, déterminée extemporanément (en %), conformément au paragraphe 5.14 et 584,5 = masse moléculaire de $\text{NaCl} \times 10$ (en g).

5.17 Degré de substitution

5.17.1 Objectif

Cette méthode sert à déterminer le degré d'étherification (de substitution) des carboxyméthylcellulose utilisée.

5.17.2 Résumé de la méthode d'essai

La carboxyméthylcellulose préalablement purifiée est minéralisée en présence d'acide sulfurique. Le poids de sulfate de sodium résiduel permet de connaître la teneur en sodium et par là le degré de substitution.

5.17.3 Importance et utilisation

Cette méthode d'essai sert à déterminer le nombre de groupes substituants ajoutés au squelette de cellulose de base.

5.17.4 Matériel

- 5.17.4.1 Fiole conique de 500 mL.
- 5.17.4.2 Balance de précision.
- 5.17.4.3 Filtre en verre fritté.
- 5.17.4.4 Fiole à vide.
- 5.17.4.5 Creuset en porcelaine.
- 5.17.4.6 Etuve à 110°C.
- 5.17.4.7 Dessiccateur
- 5.17.4.8 Bec Bunsen ou four à moufle à 600°C.

5.17.5 Réactifs

- 5.17.5.1 Méthanol ou éthanol (pureté $\geq 98\%$)
- 5.17.5.2 Nitrate d'argent (AgNO_3) 0,1N
- 5.17.5.3 Acétone (pureté $\geq 99\%$)
- 5.17.5.4 Acide sulfurique (pureté $\geq 96\%$)
- 5.17.5.5 Carbonate d'ammonium (NH_4HCO_3)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.17.6 Préparation de l'échantillon

(Cette étape n'est pas nécessaire s'il est avéré que l'échantillon contient au moins 99,5% de carboxyméthylcellulose) Peser 5 g de l'échantillon $\pm 0,1$ mg, et le transférer dans une fiole conique de 500 mL. Ajouter 350 mL de méthanol ou d'éthanol (80% en volume). Agiter la suspension pendant 30 min. A l'aide d'une fiole à vide, filtrer sur verre fritté doux. A la fin de la filtration, éviter d'aspirer de l'air à travers le rétentat. Répétez le traitement jusqu'à ce que l'essai au nitrate d'argent 0,1 N pour les ions chlorures soit négatif pour les filtrats. Normalement, trois lavages sont suffisants. Transférer la carboxyméthylcellulose dans le même creuset. Eliminer les traces d'alcool en rinçant avec de l'acétone. Laisser l'acétone s'évaporer à l'air (sous une hotte) puis dans une étuve à 110°C jusqu'à poids constant. Peser la première fois après deux heures. Refroidir le creuset à chaque fois dans un dessiccateur et faire attention lors de la pesée au fait que la carboxyméthylcellulose sodique est légèrement hygroscopique.

5.17.7 Méthode d'essai

Dans un creuset de porcelaine préalablement taré, peser 2 g $\pm 0,1$ mg, de substance séchée selon la préparation ci-dessus. Carboniser au bec Bunsen, au départ, soigneusement avec une petite flamme et par la suite pendant 10 min, avec une grande flamme. Refroidir, puis verser 3 à 5 mL d'acide sulfurique concentré sur le résidu. Chauffer à la flamme jusqu'à ce que le dégagement de fumée soit terminé. Après refroidissement ajouter environ 1 g de carbonate d'ammonium en versant la poudre sur l'ensemble du contenu du creuset. Chauffer à nouveau, d'abord avec une petite flamme jusqu'à ce que le dégagement de fumée soit fini puis au rouge profond pendant 10 min. Répétez le traitement à l'acide sulfurique et au carbonate d'ammonium si le sulfate de sodium résiduel contient toujours du carbone. Laisser refroidir le creuset dans un dessiccateur et peser. Au lieu d'ajouter du carbonate d'ammonium et de chauffer à la flamme, le creuset peut être placé pendant une heure dans un four à environ 600°C.

5.17.8 Calculer la teneur en sodium de l'échantillon extrait à l'alcool par la formule :

a = poids du sulfate de sodium résiduel
 b = poids de l'échantillon extrait à l'alcool sec

5.17.9 Calculer le degré de substitution par la formule:

$$\text{Degré de substitution} = \frac{162 \times \% \text{ sodium}}{2300 - (80 \times \% \text{ sodium})}$$

5.18 Composition en carboxyméthylcellulose

Calculer le pourcentage de carboxyméthylcellulose de sodium dans l'échantillon en soustrayant de 100% la somme des pourcentages de sodium et de chlorure de sodium glycolate (glycolate libre), déterminés séparément par les procédures ci-dessus.

Teneur en carboxyméthylcellulose (en%) = 100 - (% NaCl + % glycolate de sodium)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

5.19 Mesure de la viscosité

5.19.1. Objectif

5.19.1.1 Il s'agit d'une méthode d'essai destinée à déterminer la viscosité de solutions aqueuses de carboxyméthylcellulose dans la limite de 10 à 10 000 mPa.s⁻¹ à 25°C.

5.19.1.2 La concentration utilisée pour l'essai doit être telle que la détermination de la viscosité de la solution sera possible dans les limites du test.

5.19.1.3 Les résultats de la mesure de la viscosité de la carboxyméthylcellulose par la présente méthode d'essai n'est pas nécessairement identique aux résultats obtenus avec d'autres types d'instruments utilisés pour les mesures de viscosité.

5.19.1.4 Les déterminations sont calculés sur un poids sec, ce qui impose de connaître le taux d'humidité de la carboxyméthylcellulose (voir §5.14).

5.19.1.5 Les mobiles Brookfield (spindles) et les vitesses indiquées dans le tableau 1 sont recommandées, mais peuvent être adaptées pour plus de commodité.

TABLEAU 1 : Mobiles et vitesses requises par le viscosimètre

Domaine de viscosité, (en mPa.s ⁻¹)	mobile n°	vitesse (en tr.min ⁻¹)	Echelle	Facteur
10 to 100	1	60	100	1
100 to 200	1	30	100	2
200 to 1000	2	30	100	10
1000 to 4000	3	30	100	40

5.19.2. Intérêt et utilisation

Cette méthode d'essai permet d'estimer le poids moléculaire des carboxyméthylcellulose

5.19.3. Matériel

5.19.3.1 Viscosimètre de type Brookfield.

5.19.3.2 Récipient en verre, d'environ 64 mm (2 ½ in) de diamètre et 152 mm (6 in) de haut, à bord droit, capacité de 340 g (12 oz).

5.19.3.3 Balance de précision

5.19.3.4 Agitateurs mécaniques avec une pale en acier inoxydable fixé à un moteur à vitesse variable capable de fonctionner à 900 ± 100 tr.min⁻¹ sous différentes conditions de charge.

5.19.3.5 Bain-marie, à 25°C ± 0,5°C.

5.19.3.6 Thermomètre de précision capable de lire des températures dans la gamme 20 à 30°C ± 0,1°C.

5.19.4. Méthode d'essai

5.19.4.1 détermination de l'humidité selon le § 5.14.

5.19.4.2 Calculer le poids sec de l'échantillon, M , en grammes nécessaire pour préparer 240 g de la solution d'essai comme suit :

$$M = 100 A / (100 - B)$$

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

où:

A = masse sèche souhaitée de l'échantillon en g, et

B = le taux d'humidité de l'échantillon en %.

5.19.4.3 Calculer la quantité d'eau distillée comme suit:

$$V = 240 - S$$

où:

V = volume d'eau distillée en mL et

S = masse de l'échantillon en g.

5.19.4.4 Ajouter la quantité d'eau calculée dans le récipient. La position de l'agitateur doit permettre un débattement minimal entre les pales et le fond du récipient.

5.19.4.5 Démarrer lentement l'agitation et ajouter la carboxyméthylcellulose. Ajustez la vitesse en remuant à environ $900 \pm 100 \text{ tr.min}^{-1}$ et mélanger pendant 2 h. Ne pas laisser l'agitation dépasser 1200 tr.min^{-1} car des vitesses plus élevées ont tendance à affecter la viscosité de certaines carboxyméthylcellulose.

REMARQUE: Si l'échantillon est ajouté trop rapidement, une agglomération va se produire. Qui pourrait empêcher la dissolution complète de l'échantillon dans le temps indiqué.

5.19.4.6 Arrêter l'agitation et transférer le récipient contenant l'échantillon dans le bain marie jusqu'à température constante (environ une heure). Vérifier la température de l'échantillon avec un thermomètre au bout d'une heure et veiller à ce que la température d'essai ait été atteinte.

5.19.4.7 Enlever le récipient contenant l'échantillon du bain marie et agiter vigoureusement pendant 10 s. Mesurer de la viscosité avec le viscosimètre Brookfield, en choisissant le mobile et la vitesse selon le tableau 1. Laisser le mobile tourner pendant trois minutes avant d'effectuer la lecture.

5.19.5. Calcul

28.1 Calculer la viscosité, V , en millipascals par seconde (mPa.s^{-1}) comme suit:

$$V = \text{lecture} \times \text{facteur}$$

5.19.6. Expression du résultat

Exprimer le résultat de la viscosité Brookfield à 25°C , en indiquant la concentration de la solution le mobile et la vitesse de mobile utilisés.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 367/2009

MONOGRAPHIE SUR LES CHITINE-GLUCANE

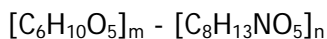
L'ASSEMBLEE GENERALE

Vu l'Article 2, paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition du groupe d'experts « Spécifications des produits oenologiques »

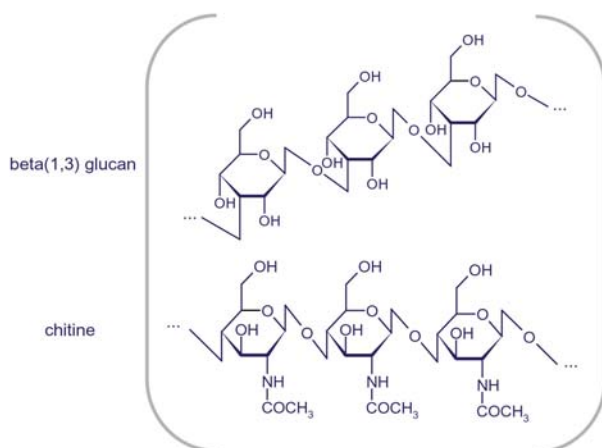
DECIDE de compléter le Codex OEnologique international par la monographie suivante :

CHITINE-GLUCANE



Numéro CAS Chitine : [1398-61-4]

Numéro CAS β -glucan : [9041-22-9]



1 OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le chitine-glucane d'origine fongique est un copolymère naturel, le constituant principal des parois cellulaires d'*Aspergillus niger*. Il est extrait et purifié à partir du mycelium d'*Aspergillus niger*. Cette ressource fongique est un sous-produit de production de l'acide citrique à destination des marchés alimentaires et pharmaceutiques.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Le chitine glucane est constitué des polysaccharides chitine (unités de répétition N-acetyl-D-glucosamine) et 1,3- β -glucane (unité de répétition D-glucose). Les deux polymères sont liés de manière covalente et forment un réseau tridimensionnel. La proportion chitine/glucane est de 25:75 à 60:40 (m/m).

Il est utilisé comme agent de collage des moûts au moment du débouillage afin de réduire la teneur en colloïdes et la turbidité.

Il est également utilisé pour la stabilisation des vins avant mise en bouteilles après la fermentation alcoolique des vins. Ce polymère a un pouvoir stabilisant vis-à-vis des casses ferriques. Il permet également d'éliminer des composés indésirables tels que les métaux lourds (plomb, cadmium), les mycotoxines, etc.

2 SYNONYMES

Poly(N-acetyl-D-glucosamine)-poly(D-glucose) et 1,3- β -glucane

3 ETIQUETAGE

Les indications suivantes doivent figurer sur l'étiquette d'emballage : origine fongique, produit à usage œnologique, les conditions d'utilisation, de conservation et la date limite d'utilisation.

4 CARACTERES

4.1 Aspect

Le chitine-glucane se présente sous forme de poudre inodore, sans saveur et de couleur blanche. Le chitine-glucane est pratiquement totalement insoluble en milieu aqueux ou organique.

4.2 Pureté et résidus solubles

La pureté du produit doit être égale ou supérieure à 95 %.

Placer en solution 5 g de chitine-glucane dans 100 ml d'eau bi-distillée et agiter 2 minutes. Filtrer après refroidissement sur filtre serré ou sur membrane.

Evaporer le filtrat et sécher à 100-105 °C. La teneur en matières solubles ne doit pas être supérieure à 5 %.

5 ESSAIS

5.1 Identification et rapport chitine-glucane

5.1.1 Détermination du rapport chitine-glucane

On détermine le rapport chitine/glucane à l'aide du spectre de RMN ^{13}C en phase solide, par comparaison avec le spectre d'un témoin chitine pure.

Cette méthode est détaillée en annexe I.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.2 Perte à la dessiccation

Dans une coupelle en verre, préalablement séchée pendant 1 heure à l'étuve 100-105 °C et refroidie dans un dessiccateur, placer 10 g du produit à analyser. Laisser dessécher dans l'étuve à 100-105 °C jusqu'à masse constante. Peser la quantité de résidu sec après refroidissement au dessiccateur.

La perte de poids doit être inférieure à 10 %.

Remarque : toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées en poids sec hormis pour les analyses microbiologiques

5.3 Cendres

Incérer sans dépasser 600°C le résidu laissé dans la détermination de la perte à la dessiccation décrit à l'alinéa 5.2. Laisser la calcination s'effectuer pendant 6 heures. Laisser le creuset refroidir dans un dessiccateur et peser.

Le taux de cendres totales ne doit pas être supérieur à 3%.

5.4 Préparation de la solution pour les essais

Avant le dosage des métaux, l'échantillon est mis en solution par une digestion acide (HNO₃, H₂O₂ et HCl). La minéralisation s'opère en microonde fermé. L'échantillon ne subit ni broyage ni séchage avant minéralisation.

Les réactifs utilisés sont les suivants HNO₃ (65%) (Suprapur), HCl (37%) (Suprapur), H₂O₂ (35%) pour la minéralisation du chitine-glucane. L'échantillon de chitine-glucane 0,5 à 2 g est placé dans un matras auquel est ajouté 25 ml d' HNO₃, 2 ml d' HCl et 3 ml d' H₂O₂. L'ensemble est alors soumis à une digestion par micro-ondes (Puissance de 60% pendant 1 min, 30% pendant 10 min, 15% pendant 3 min, et 40% pendant 15 min). La solution est alors diluée et portée à un volume final de 25,0 ml dans une fiole jaugée à l'aide d'eau bidistillée.

Les teneurs des métaux peuvent alors être recherchées.

5.5 Plomb

Le plomb est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en plomb doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du plomb par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.6 Mercure

Le mercure est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

La teneur en mercure doit être inférieure à 0,1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du mercure par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.7 Arsenic

L'arsenic est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage de l'arsenic par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.8 Cadmium

Le cadmium est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du cadmium par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.9 Chrome

Le chrome est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en chrome doit être inférieure à 10 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du chrome par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.10 Zinc

Le zinc est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en zinc doit être inférieure à 50 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du zinc par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.11 Fer

Le fer est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en fer doit être inférieure à 100 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du fer par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.12 Cuivre

Le cuivre est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe II.

La teneur en cuivre doit être inférieure à 30 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du cuivre par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.13 CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE

5.13.1 Germes totaux

Le dénombrement des germes totaux est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30 °C sur milieu PCA décrite en annexe III.

Moins de 1000 UFC/g de préparation.

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international.

5.13.2 Enterobactéries

Le dénombrement des Entérobactéries est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30°C décrite en annexe IV.

Moins de 10 UFC/g de préparation.

5.13.3 Salmonelles

Procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international

Absence contrôlée sur un échantillon de 25 g.

5.13.4 Coliformes

Procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international.

Moins de 100 UFC/g de préparation

5.13.5 Levures

Le dénombrement des Levures est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 25 °C sur milieu YGC décrite en annexe V.

Moins de 100 UFC/g de préparation.

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.13.6 Moisissures

Le dénombrement des Moisissures est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 25 °C sur milieu YGC décrite en annexe VI.
Moins de 100 UFC/g de préparation.

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Oenologique international.

6 RECHERCHE EN OCHRATOXINE A

Placer le chitine-glucane en solution aqueuse (eau distillée) à 1% et agiter pendant 1 heure, puis effectuer le dosage à l'aide de la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.
Moins de 5 µg/kg.

7 CONSERVATION

Conserver en emballage clos, à l'abri de l'humidité, dans des locaux tempérés

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe I

DOSAGE de détermination du rapport chitine/glucan

1. PRINCIPE

Cette méthode consiste à déterminer le rapport chitine/glucane à l'aide du spectre de RMN ¹³C en phase solide.

2. RÉACTIFS ET MATÉRIEL

- 2.1. Echantillon de chitine glucane
- 2.2. Eau osmosée
- 2.3. Acide chlorhydrique 1M
- 2.4. Ethanol pur
- 2.5. Chloroforme pur
- 2.6. Méthanol pur
- 2.7. Acétone
- 2.8. Matériel courant de laboratoire, pipettes, vases cylindriques en verre, filtres de porosité 30 µm...
- 2.9. Agitateur rotatif
- 2.10. Centrifugeuse de laboratoire
- 2.11. Conductimètre.
- 2.12. Appareil de résonance magnétique nucléaire

3. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Avant le dosage, les échantillons sont préparés suivant un protocole précis décrit ci-après :

3.1. Lavage à l'HCl 1M (2.3)

Cette étape consiste à mélanger dans un tube 2g de chitine glucane (2.1) et 40ml de HCl 1M

Ce mélange est agité 30min à 320 rpm puis centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. On élimine le surnageant.

Cette étape est renouvelée une fois

3.2. Lavage à l'eau osmosée

Cette étape consiste à mélanger le culot de l'étape précédente avec 40 ml d'eau osmosée (2.2)

Ce mélange est centrifugé 10 min à 4000 rpm. On élimine le surnageant.

Cette étape est renouvelée jusqu'à obtenir une conductivité du surnageant inférieure à 100µS/cm².

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

3.3. Lavage à l'éthanol

Cette étape consiste à mélanger le culot de l'étape précédente avec 40ml d'éthanol (2.4). Ce mélange est centrifugé 10 min à 4000 rpm. On élimine le surnageant. Cette étape est renouvelée une fois

3.4. Lavage au chloroforme/méthanol

Cette étape consiste à mélanger le culot de l'étape précédente avec 40ml d'un mélange 50/50,v/v de chloroforme (2.5) et méthanol (2.6).Ce mélange est agité 30min à 320 rpm puis centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. On élimine le surnageant. Cette étape est renouvelée une fois

3.5. Lavage à l'acétone et séchage

Cette étape consiste à mélanger le culot de l'étape précédente avec 40ml d'acétone (2.7). Ce mélange est agité 30min à 320 rpm puis centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. Après la centrifugation, verser le surnageant sur un filtre de 30 µm, rincer le tube flacon avec de l'acétone (2.7) et verser le tout sur le filtre. Déposer la matière située sur le filtre dans un cristalliseur et laisser sécher. Après le séchage, le produit est prêt à être analysé par RMN.

4. MODE OPERATOIRE

Les échantillons préparés sont ensuite analysés sur l'appareil de résonance magnétique nucléaire Bruncker avance DSX 400WB.(ou équivalent)

Les conditions d'analyses sont les suivantes :

- 4.1 Champ magnétique : 9,04 Tesla
- 4.2 Fréquence de Larmor : 83 kHz
- 4.3 Temps écoulé entre 2 impulsions magnétiques : 5s
- 4.4 Temps écoulé pendant lequel l'impulsion magnétique est appliquée : 5,5ms
- 4.5 Nombre de séquence d'impulsion magnétique : 3000

5. EXPRESSION DES RESULTATS

5.1 La proportion en beta-glucane est déterminée à partir de l'aire des quatre bandes de résonance.

5.2 Les résultats sont exprimés en mol%.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe II

DOSAGE DES METAUX PAR Spectroscopie d'émission atomique

1. PRINCIPE

Cette méthode consiste à mesurer l'émission atomique par une technique de spectroscopie optique.

2. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Avant le dosage des métaux, l'échantillon est mis en solution par une digestion acide (HNO_3 , H_2O_2 et HCl). La minéralisation s'opère en microonde fermé. L'échantillon ne subit ni broyage ni séchage avant minéralisation.

Les réactifs utilisés sont les suivants HNO_3 (65%) (Suprapur), HCl (37%) (Suprapur), H_2O_2 (35%) pour la minéralisation du chitosane. L'échantillon de chitine-glucane 0,5 à 2 g est placé dans un matras auquel est ajouté 25 ml d' HNO_3 , 2 mL d' HCl et 3 ml d' H_2O_2 . L'ensemble est alors soumis à une digestion par micro-ondes (Puissance de 60% pendant 1 min, 30% pendant 10 min, 15% pendant 3 min, et 40% pendant 15 min). La solution est alors diluée et portée à un volume final de 25,0 ml dans une fiole jaugée à l'aide d'eau bidistillée.

Les teneurs des métaux peuvent alors être recherchées.

3. MODE OPERATOIRE

Les échantillons mis en solution sont nébulisés et l'aérosol ainsi produit est transporté dans une torche à plasma induit par un champ électrique à haute fréquence. Les spectres d'émission sont dispersés par un spectromètre à réseau et l'intensité des raies est évaluée par un détecteur (photomultiplicateur). Les signaux du détecteur sont traités et contrôlés par un système informatique. Une correction du bruit de fond est utilisée pour compenser les variations de bruit de fond.

4. EXPRESSION DES RESULTATS

Les concentrations en métaux dans les produits œnologiques sont exprimées en mg/kg

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe III

Dénombrement des germes totaux par comptage des colonies obtenues à 30 °C

Milieu PCA

Composition :

Peptone	5,0g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1,0g
Agar-agar	15g
Ajuster à	pH 7,0
Eau	q.s.p 1000 ml

Stérilisation

Les boîtes de Pétri sontensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spirale.

Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 30 °C en aérobiose pendant 48 à 72 heures.

Compter le nombre d'UFC

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe IV

Dénombrement des Entérocoqueries est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30°C

Milieu VRBG

Composition :

Peptone	7g
Extrait de levure	3g
Glucose	10g
Chlorure de sodium	5g
Violet cristal	0,002g
Rouge neutre	0,03g
Agar-agar	13g
Mélange de sels biliaires	1,5g
Ajuster à	pH 7,4
Eau	q.s.p 1000 ml

Stérilisation

Les boîtes de Pétri sontensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spiral.

Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 30 °C en aérobiose pendant 18 à 24 heures.

Compter le nombre d'UFC

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe V
Dénombrement des levures par comptage

Milieu YGC

Composition :

Extrait de levure	5,0g
D-(+)glucose	20g
Agar-agar	14,9g
Choramphénicol	0,1g
Ajuster à	pH 6,6
Eau	q.s.p 1000 ml

Stérilisation

Les boîtes de Pétri sontensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spirale.

Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 25 °C en aérobiose pendant 3 à 5 jours sans retourner les boîtes.

Compter le nombre de levures

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

Annexe VI
Dénombrement des moisissures par comptage

Milieu YGC

Composition :

Extrait de levure	5,0g
D-(+)glucose	20g
Agar-agar	14,9g
Choramphénicol	0,1g
Ajuster à	pH 6,6
Eau	q.s.p 1000 ml

Stérilisation

Les boîtes de Pétri sontensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spiral.

Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 25 °C en aérobiose pendant 3 à 5 jours sans retourner les boîtes.

Compter le nombre de moisissures

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale



RÉSOLUTION OIV/OENO 368/2009

MONOGRAPHIE SUR LE CHITOSANE

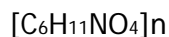
L'ASSEMBLEE GENERALE

Vu l'Article 2, paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

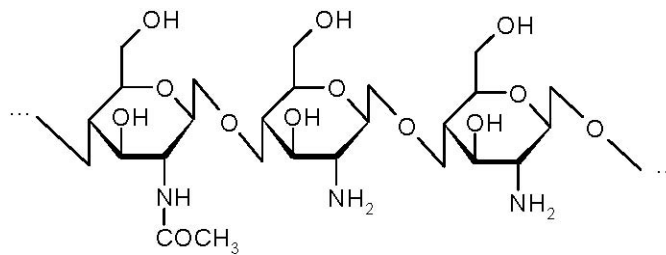
Sur proposition du groupe d'experts « Spécifications des produits oenologiques »

DECIDE de compléter le Codex OEnologique international par la monographie suivante :

CHITOSANE



Numéro CAS Chitosane: [9012-76-4]



Chitosane

1 OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Le chitosane est un polysaccharide préparé à partir d'une origine fongique . Il est extrait et purifié à partir de sources fongiques alimentaires ou biotechnologique sûres et abondantes tels que *Agaricus bisporus* ou *Aspergillus niger*. Le chitosane est obtenu par hydrolyse d'un extrait riche en chitine. La chitine est un polysaccharide composé de plusieurs unités N-acétyl-D-glucosamine reliées entre elles par une liaison de type β (1,4). Le chitosane est constitué des unités sucres glucosamine (unités désacétylées) et d'unités N-acétyl-D-glucosamine (unités acétylées) reliées entre elles par des liaisons de type β (1,4).

2 SYNONYMES

Poly(N-acetyl-D-glucosamine)-poly(D-glucose)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

3 ETIQUETAGE

Les indications suivantes doivent figurer sur l'étiquette d'emballage : origine exclusivement fongique, produit à usage œnologique, les conditions d'utilisation, de conservation et la date limite d'utilisation.

4 CARACTERES

4.1 Aspect et solubilité

Le chitosane se présente sous forme de poudre inodore, sans saveur et de couleur blanche. La poudre est pratiquement totalement insoluble en milieu aqueux ou organique.

4.2 Pureté et résidus solubles

La pureté du produit doit être égale ou supérieure à 95 %.
Placer en solution 5 g de chitosane dans 100 ml d'eau bi-distillée et agiter 2 minutes.
Filtrer après refroidissement sur filtre serré ou sur membrane.
Evaporer le filtrat et sécher à 100-105 °C. La teneur en matières solubles ne doit pas être supérieure à 5 %.

5 ESSAIS

5.1 Identification, du degré d'acétylation et de l'origine du chitosane

5.1.1 Détermination du degré d'acétylation

On détermine le degré d'acétylation par titration potentiométrique selon la méthode décrite en Annexe I.

5.1.2 Détermination de la source

Le chitosane, polymère naturel est extrait et purifié en partant de sources fongiques ; il est obtenu par hydrolyse d'un extrait riche en chitine. Ce chitosane est défini comme identique au chitosane provenant de crustacés en termes de structures et de propriétés.

Une identification de l'origine du chitosane est faite par un ensemble de 3 caractéristiques: la teneur en glucanes résiduels (voir méthode en annexe II), la viscosité du chitosane en solution 1% et la densité tapée (après tassement).

Seul le chitosane d'origine fongique possède, à la fois, une teneur en glucanes résiduels > à 2%, une densité tapée \geq à 0,7g/cm³ et une viscosité en solution 1% dans de l'acide acétique 1% < à 15 cPs.

5.2 Perte à la dessiccation

Dans une coupelle en verre, préalablement séchée pendant 1 heure à l'étuve 100-105 °C et refroidie dans un dessiccateur, placer 10 g du produit à analyser. Laisser dessécher dans l'étuve à 100-105 °C jusqu'à masse constante. Peser la quantité de résidu sec après refroidissement au dessiccateur.

La perte de poids doit être inférieure à 10%.

Remarque : toutes les limites fixées ci-dessous sont rapportées en poids sec hormis pour les analyses microbiologiques

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.3 Cendres

Incinérer sans dépasser 600 °C le résidu laissé dans la détermination de la perte à la dessiccation décrit en 5.2. Laisser la calcination s'effectuer pendant 6 heures. Laisser le creuset refroidir dans un dessiccateur et peser.

Le taux de cendres totales ne doit pas être supérieur à 3 % en poids.

5.4 Préparation de la solution pour les essais

Avant le dosage des métaux, l'échantillon est mis en solution par une digestion acide (HNO₃, H₂O₂ et HCl). La minéralisation s'opère en microonde fermé. L'échantillon ne subit ni broyage ni séchage avant minéralisation.

Les réactifs utilisés sont les suivants HNO₃ (65%) (Suprapur), HCl (37%) (Suprapur), H₂O₂ (35%) pour la minéralisation du chitosane. L'échantillon de chitosane 0,5 à 2 g est placé dans un matras auquel est ajouté 25 mL d' HNO₃, 2 mL d'HCl et 3 mL d' H₂O₂. L'ensemble est alors soumis à une digestion par micro-ondes d'une puissance max de 1200 watt : Puissance de 60% pendant 1 min, 30% pendant 10 min, 15% pendant 3 min, et 40% pendant 15 min. La solution est alors diluée et portée à un volume final de 25,0 mL dans une fiole jaugée à l'aide d'eau bidistillée. Les teneurs des métaux peuvent alors être recherchées.

5.5 Plomb

Le plomb est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III.

La teneur en plomb doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du plomb par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

5.6 Mercure

Le mercure est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III.

La teneur en mercure doit être inférieure à 0,1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du mercure par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

5.7 Arsenic

L'arsenic est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage de l'arsenic par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

5.8 Cadmium

Le cadmium est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du cadmium par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

5.9 Chrome

Le chrome est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III.

La teneur en chrome doit être inférieure à 10 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du chrome par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

5.10 Zinc

Le zinc est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III.

La teneur en zinc doit être inférieure à 50 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du zinc par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

5.11 Fer

Le fer est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III.

La teneur en fer doit être inférieure à 100 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du fer par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

5.12 Cuivre

Le cuivre est dosé par spectrophotométrie d'émission atomique selon la méthode décrite en annexe III.

La teneur en cuivre doit être inférieure à 30 mg/kg.

Il est également possible de procéder au dosage du cuivre par absorption atomique selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Œnologique international

5.13 CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE

5.13.1 Germes totaux

Le dénombrement des Germes totaux est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30°C sur milieu PCA décrite en annexe IV.

Moins de 1000 UFC/g de préparation.

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.13.2 Enterobactéries

Le dénombrement des Entérobactéries est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 30°C sur milieu VRBG décrite en annexe V.
Moins de 10 UFC/g de préparation.

5.13.3 Salmonelles

Procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international Absence contrôlée sur un échantillon de 25g.

5.13.4 Coliformes

Procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international Moins de 100 UFC/g de préparation

5.13.5 Levures

Le dénombrement des Levures est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 25°C sur milieu YGC décrite en annexe VI. Moins de 100 UFC/g de préparation

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international

5.13.6 Moisissures

Le dénombrement des moisissures est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage de colonies à 25°C sur milieu YGC décrite en annexe VII.

Moins de 100 UFC/g de préparation.

Il est également possible de procéder au dénombrement comme il est décrit au chapitre II du Codex Œnologique international

6 RECHERCHE EN OCHRATOXINE A

Placer le chitosane en solution aqueuse (eau distillée) à 1% et agiter pendant 1 heure, puis effectuer le dosage à l'aide de la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

Moins de 5 µg/kg

7 CONSERVATION

Conserver en emballage clos, à l'abri de l'humidité, dans des locaux tempérés

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe I DETERMINATION DU DEGRE D'ACETYLATION

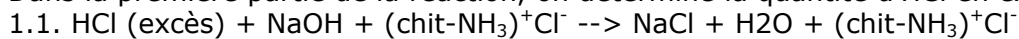
1. PRINCIPE

Le degré d'acétylation est le rapport du nombre d'unités N-acétyl-glucosamine sur le nombre de monomères totaux.

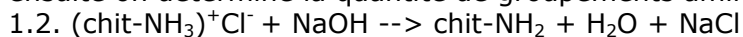
Cette méthode consiste à déterminer le degré d'acétylation du chitosane par titration des groupes amines. Elle est basée sur les travaux de Rinaudo et al.,(1999) qui ont déterminé le pKa de la fraction amine libre du chitosane : pKa : 6,5.

Le chitosane est mis en solution dans un milieu acide, les groupements amines (sur les unités de glucosamine non acétylées (G)) sont chargées positivement (HCl en excès)).

Dans la première partie de la réaction, on détermine la quantité d'HCl en excès :



ensuite on détermine la quantité de groupements amines chargés :



La différence entre les deux volumes de NaOH permet de connaître la quantité d'amines libres.

2. REACTIFS ET MATERIELS

2.1. Préparation commerciale de chitosane

2.2. Eau distillée ou désionisée

2.3. Acide chlorhydrique 0,3 M

2.4. Hydroxyde de sodium 0,1M

2.5 Verrerie courante de laboratoire : vases cylindriques, pipettes, burette...

2.6. Agitateur magnétique et barreau aimanté

2.7. PHmètre avec sonde de température.

3. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Avant le dosage les échantillons sont préparés suivant le protocole précis décrit ci-après :

100 mg de chitosane (2.1) sont déposés dans un vase cylindrique auquel on ajoute 3 ml d'HCl 0,3 M (2.3) et 40 ml d'eau (2.2). Mettre en agitation pendant 12 heures (2.6).

4. MODE OPERATOIRE

- Introduire l'électrode pH du pH-mètre (2.7) ainsi que la sonde de température dans le vase cylindrique. Vérifier que le pH de la solution de chitosane est inférieur à 3, sinon ajouter avec la pipette de l'HCl 0,3M (2.3).

- Neutraliser l'HCl en excès l'aide de NaOH 0,1M (2.4) en afin d'obtenir un pH de l'ordre de 4,5 correspondant à pKa -2 de la fraction amines libres. Soit V1 ml le volume de NaOH versé (réaction 1.1)

- Continuer l'addition de NaOH (2.4) pour obtenir un pH de 8,5 correspondant à pKa +2 de la fraction amines libres. Soit V2 ml le volume de NaOH versé (réaction 1.2) (incluant le premier ajout V1)

Pour amener le milieu à pH 4,5, le volume V1 ml de NaOH 0,1M est généralement compris entre 3 et 4 ml.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Puis pour amener le milieu à pH 8,5, le volume total V2 ml de NaOH 0,1 M est généralement compris entre 8 et 9 ml.
Ces opérations peuvent être réalisées par titrage automatique.

5. EXPRESSION DES RESULTATS

Le degré d'acétylation du chitosane est exprimé en %. Cette formule est le rapport entre la masse d'unités de glucosamine acétylée (G^{a1}) en g dans l'échantillon sur la masse (G^{a2}) en g si tous les groupements étaient acétylés avec :

$$Q = (V_{NaOH} \times 0,1) / (1000 \times M_{cs})$$

= nombre de moles de la fraction aminée du chitosane pour un échantillon de 1g

Mcs : masse sèche de chitosane dans la prise d'essai, en g

$$V_{NaOH} = V2 - V1$$

= volume versé en ml de NaOH 0,1M entre pH 4,5 et pH 8,5.

Le facteur 1000 vient du fait que V_{NaOH} est en ml

Soient G = partie Glucosamine et ^a = partie acétylée

G^{a1} = masse en g des unités de glucosamine acétylée réellement présentes dans l'échantillon

G^{a2} = masse en g des unités de glucosamine acétylée qu'il y aurait si tous les groupements étaient acétylés

Masse G^{a1} réellement présente (en g) =

1g- la masse de G

1g - (nombre de moles de groupements G par g) X masse moléculaire G (partie glucosamine)

1g - Q X 162

Masse G^{a2} si tous les groupements non acétylés étaient acétylés (en g) =

1g + la masse des ^a

1g + (nombre de mole de groupements G par g) X masse moléculaire ^a (partie acétylée)

1g + Q X 43

Degré d'acétylation :

$$DA = (1-162 \times Q) / (1+ 43 \times Q)$$

Bibliographie

Rinaudo, M., G. Pavlov and J. Desbrieres. 1999. Influenced of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polym.* 40, 7029-7032

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe II

DETERMINATION DE LA TENEUR EN GLUCANES RESIDUELS

1. PRINCIPE

Cette méthode consiste à déterminer la teneur en glucanes résiduels du chitosane par spectrophotométrie.

Cette méthode est basée sur une réaction colorimétrique dont la réponse dépend de la dégradation des hydrates de carbone par l'acide sulfurique concentré chaud.

Cette dégradation donne un composé jaune brun dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en glucanes résiduels.

2. REACTIFS ET MATERIELS

2.1 Glucane de pureté 97% (Société Mégazyme)

2.2 Préparation commerciale de chitosane

2.3 Eau distillée ou désionisée

2.4 Ethanol

2.5 Acide acétique 1%

2.6 Solution phénol 5%

2.7 Acide acétique glacial 100%

2.8 Verrerie courante de laboratoire : vase cylindriques, pipette, ballon jaugé,...

2.9 Agitateur magnétique et barreau aimanté

2.10 Chronomètre

3. PREPARATION DE LA GAMME ETALON

Une solution mère de glucanes est préparée suivant un protocole précis décrit ci-après :

- 500mg de glucanes (2.1) sont introduits dans une fiole jaugée de 100ml auquel on ajoute 6ml d'éthanol (2.4) et 80ml d'eau (2.3).

- Agiter et porter à ébullition pour permettre la dissolution des glucanes Laisser refroidir ajuster au trait de jauge avec de l'eau Laisser agiter 30 minutes.

- Prélever 1ml de cette solution dans une fiole jaugée de 50 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'acide acétique 1% (2.5). La solution est prête à l'emploi pour réaliser la gamme étalon suivant le protocole ci-après.

V sol mère (ml)	V eau (ml)	M glucanes (µg)
0	1	0
0,1	0,9	10
0,3	0,7	30
0,5	0,5	50
0,7	0,3	70

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

4. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Avant le dosage les échantillons sont préparés suivant un protocole précis décrit ci-après : 100mg de chitosane (2.2) sont déposés dans un ballon jaugé de 50ml auquel on ajoute 25ml d'acide acétique 1% (2.5).

Laisser agiter pendant 12 heures puis ajuster au trait de jauge.

5. MODE OPERATOIRE

- Dans un tube à essai, ajouter 1ml de la solution échantillon à analyser, 1ml de phénol à 5% (2.6) et 5ml d'acide sulfurique concentré (2.7).

- Agiter au vortex pendant 10 s puis laisser refroidir pendant 1heure.

- L'absorbance est ensuite mesurée à 490nm.

6. EXPRESSION DES RESULTATS

L'absorbance est mesurée à 490nm. Le spectrophotomètre calcule la teneur en glucanes dans les échantillons à partir de la courbe de calibration (0-70 µg). Cette teneur s'exprime en µg/g de chitosane.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe III

DOSAGE DES METAUX PAR Spectroscopie d'émission atomique

1. PRINCIPE

Cette méthode consiste à mesurer l'émission atomique par une technique de spectroscopie optique.

2. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Avant le dosage des métaux, l'échantillon est mis en solution par une digestion acide (HNO₃, H₂O₂ et HCl). La minéralisation s'opère en microonde fermé. L'échantillon ne subit ni broyage ni séchage avant minéralisation. Les réactifs utilisés sont les suivants HNO₃ (65%) (Suprapur), HCl (37%) (Suprapur), H₂O₂ (35%) pour la minéralisation du chitosane. L'échantillon de chitosane 0,5 à 2 g est placé dans un matras auquel est ajouté 25 ml d' HNO₃, 2 ml d'HCl et 3 ml d' H₂O₂. L'ensemble est alors soumis à une digestion par micro-ondes (Puissance de 60% pendant 1 min, 30% pendant 10 min, 15% pendant 3 min, et 40% pendant 15 min). La solution est alors diluée et portée à un volume final de 25.0 ml dans une fiole jaugée à l'aide d'eau bidistillée. Les teneurs des métaux peuvent alors être recherchées

3. MODE OPERATOIRE

Les échantillons mis en solution sont nébulisés et l'aérosol ainsi produit est transporté dans une torche à plasma induit par un champ électrique à haute fréquence. Les spectres d'émission sont dispersés par un spectromètre à réseau et l'intensité des raies est évaluée par un détecteur (photomultiplicateur). Les signaux du détecteur sont traités et contrôlés par un système informatique. Une correction du bruit de fond est utilisée pour compenser les variations de bruit de fond.

4. EXPRESSION DES RESULTATS

Les concentrations en métaux dans les produits œnologiques sont exprimées en mg/kg

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe IV
Dénombrement des germes totaux par comptage des colonies obtenues à 30°C

Milieu PCA

Composition :

Peptone 5,0g
Extrait de levure 2,5g
Glucose 1,0g
Agar-agar 15g
Ajuster à pH 7,0
Eau q.s.p 1000 ml
Stérilisation

Les boîtes de Pétri sontensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spirale. Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 30 °C en aérobiose pendant 48 à 72 heures. Compter le nombre d'UFC

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

Annexe V
Dénombrement des Entérobactéries est réalisé suivant la méthode horizontale par comptage des colonies obtenus à 30°C

Milieu VRBG

Composition :

Peptone 7g
Extrait de levure 3g
Glucose 10g
Chlorure de sodium 5g
Agar-agar 13g
Mélange de sels biliaires 1,5g
Violet cristal 0,002g
Rouge neutre 0,03g
Ajuster à pH 7,4
Eau q.s.p 1000 ml
Stérilisation

Les boîtes de Pétri sontensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spirale. Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 30 °C en aérobiose pendant 18 à 24 heures.

Compter le nombre d'UFC

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe VI Dénombrement des levures par comptage

Milieu YGC

Composition :

Extrait de levure 5,0g

D-(+)glucose 20g

Agar-agar 14,9g

Choramphénicol 0,1g

Ajuster à pH 6,6

Eau q.s.p 1000 ml

Stérilisation

Les boîtes de Pétri sontensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spirale. Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 25 °C en aérobiose pendant 3 à 5 jours sans retourner les boîtes.

Compter le nombre de levures

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe VII
Dénombrement des moisissures par comptage

Milieu YGC

Composition :

Extrait de levure 5,0g

D-(+)glucose 20g

Agar-agar 14,9g

Choramphénicol 0,1g

Ajuster à pH 6,6

Eau q.s.p 1000 ml

Stérilisation

Les boîtes de Pétri sontensemencées par méthode boîte de Pétri coulée et méthode en spirale. Après ensemencement, elles sont mises à incuber à 25 °C en aérobiose pendant 3 à 5 jours sans retourner les boîtes.

Compter le nombre de moisissures.

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale



RÉSOLUTION OIV/OENO 377/2009

ACTUALISATION DU RECUEIL DES METHODES D'ANALYSE DES VINS ET DES MOULTS DE L'OIV
– CLASSIFICATION DES METHODES

L'ASSEMBLEE GENERALE

VU l'article 2 paragraphe 2 iii de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

VU les actions du plan stratégique de l'OIV 2009-2012

CONSIDERANT les travaux de la sous-commission « Méthodes d'analyse »,

CONSIDERANT la résolution 9/2000 adoptée par l'OIV qui définit la classification, internationalement reconnue, des méthodes d'analyse de l'OIV,

CONSIDERANT que cette résolution mentionne les quatre types de classification suivantes :

Type I (Méthode de référence Critère) : Méthode qui définit une valeur qu'il n'est possible d'établir qu'aux termes de la méthode per se et qui est, par définition, la seule utilisée pour établir la valeur acceptée du paramètre mesuré (Titre alcoométrique volumique, acidité totale, acidité volatile).

Type II (Méthode de référence) : une méthode de type II est celle que l'on désigne comme Méthode de Référence, lorsque les méthodes du type I ne sont pas applicables. On devrait la choisir parmi les méthodes de type III (définies ci-après). On devrait recommander son emploi dans les cas de litige et aux fins d'étalonnage (Potassium, acide citrique).

Type III (Méthode de remplacement approuvées) : les méthodes de type III répondent à tous les critères définis par la Sous-Commission des Méthodes d'Analyse aux fins de contrôle, d'inspection ou de réglementation (Glucose et fructose par voie enzymatique).

Type IV (Méthode provisoire) : une méthode de type IV est une méthode traditionnelle ou encore une méthode d'application récente, mais pour laquelle on n'a pas encore déterminé les critères exigés par la Sous-Commission des Méthodes d'Analyse (Recherche des colorants de synthèse, mesure du potentiel d'oxydoréduction).

CONSIDERANT que certaines méthodes d'analyses adoptées par l'OIV ne respectent pas cette nouvelle classification mais suivent l'ancienne classification adoptée en 1990 qui classe les méthodes soit en méthode de référence soit en méthode usuelle,

CONSIDERANT la nécessité de classer les anciennes méthodes selon les nouveaux critères de classification mentionnés dans la résolution 9/2000,

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

CONSIDERANT que certaines méthodes d'analyse ne sont plus utilisées et devraient être éliminées du Recueil international des moûts et des vins ,

DECIDE, sur proposition de la Commission II « Oenologie », d'adopter la nouvelle classification suivante des méthodes d'analyse figurant actuellement dans le Recueil international des moûts et des vins ,

DECIDE que les méthodes figurant dans le Recueil des méthodes d'analyse des vins et des moûts seront, si nécessaire, modifiées en conséquence.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Partie 1 : Méthodes déjà adoptée en Type I, II, III ou IV par l'OIV – Pour information seulement

Ces méthodes sont déjà adoptées selon les nouvelles définitions des méthodes d'analyse de l'OIV. Cette classification est donné à titre indicatif et ne doit pas être modifiée.

1. A : Méthodes déjà adoptées en Type I par l'OIV – Pour information seulement

TITRE	REFERENCE	PRINCIPE	TYPE METHODE	ANNEE ADOPTION
caracteristiques Chromatiques	AS2-11-CARCHR	Spectrophotométrie	I	2006
Méthode de mesure de la surpression	AS314-02-SURPRES	Aphrométrie	I	2003

1. B : Méthodes déjà adoptées en Type II par l'OIV – Pour information seulement

TITRE	REFERENCE	PRINCIPE	TYPE METHODE	ANNEE ADOPTION
Acide Shikimique	AS313-17-ACSHIK	HPLC	II	2004
Dosage du dioxyde de Carbone	AS314-01-DIOCAR	Méthode de référence: Titrimétrie	II	2006
Détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2	AS314-03-CO2MOU	SMRI	II	2005
Dioxyde de carbone	AS314-04-CO2MAN	Manométrie	II	2006
Détermination de neuf Anthocyanes principales	AS315-11-ANCYAN	HPLC	II	2003/2007
Fluorures	AS321-03-FLUORU	électrode spécifique	II	2004
Détermination du 3-Methoxypropane-1,2-diols et des glycérols cycliques	AS315-15-GLYCCYC	Chromatographie gazeuse/ spectrométrie de masse	II	2007
Sucres	AS311-03-SUCRES	HPLC	II	2003
Plomb (Criteres)	AS322-12-CHIPLO	Spectrométrie d'absorption atomique	II	2006

1. C : Méthodes déjà adoptées en Type III par l'OIV – Pour information seulement Sans objet

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

1. D : Méthodes déjà adoptées en Type IV par l'OIV – Pour information seulement

TITRE	REFERENCE	PRINCIPE	TYPE METHODE	ANNEE ADOPTION
proteines végétales	AS315-12-PROVEG	électrophorèse	IV	2004
Dosage des Acides Organiques et Anions Minéraux	AS313-16-ORGION	Chromatographie Ionique	IV	2004
Acide sorbique	AS313-18-SORCAP	électrophorèse Capillaire	IV	2006
Dosage des Acides Sorbique, Benzoïque, Salicylique	AS313-20-SOBESA	HPLC	IV	2006
Détermination de la présence d'acide métatartrique	AS313-21-METTAR	Spectrométrie	IV	2007
Polychlorophenols, polychloroanisol	AS315-13-PCAPCP	Chromatographie Gazeuse	IV	2006
Lysozyme	AS315-14-LYSOZY	HPLC	IV	2007
Polyols dérivant des sucres	AS311-06-POLYOL	Chromatographie Gazeuse	IV	2006

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Part 2 : Méthodes pour lesquelles une nouvelle classification est proposée

Ces méthodes sont adoptées et publiées selon l'ancienne caractérisation des méthodes d'analyse. Parfois, pour le même composé, il apparaît deux ou plus de principe (en fonction de la méthode de référence ou de la méthode usuelle) sous la même référence. Ainsi, il est proposé de classer ces méthodes en fonction du type I, II, III, IV en tenant compte que pour les méthodes de type II, il existe des paramètres de validation inter-laboratoires.

TITRE	REFERENCE	PRINCIPE	TYPE proposé
Acetaldehyde (ethanal)	AS315-01-ETHANA	Colorimétrie	IV
Acidité Totale	AS313-01-ACITOT	Titrimétrie	I
Acidité Fixe		Calcul	I
Acidité Volatile	AS313-02-ACIVOL	Titrimétrie après distillation	I
Titre alcoométrique volumique	AS312-01-TALVOL	Méthode de référence: pycnométrie	I
Titre alcoométrique volumique	AS312-01-TALVOL	Méthode de référence: densimétrie électronique	I
Titre alcoométrique volumique	AS312-01-TALVOL	Méthode de référence: balance hydrostatique	I
Alcalinité des cendres	AS2-05-ALCCEN	Titrimétrie	IV
Ammonium	AS322-01-AMMONI	Titrimétrie	IV
Arsenic	AS323-01-ARSENI	Méthode de référence: Spectrométrie d'absorption atomique	IV
Arsenic	AS323-01-ASSAA	Spectrométrie d'absorption atomique	IV
Arsenic	AS323-01-ARSENI	Méthode usuelle: Colorimétrie	Eliminer
Colorants artificiels	AS315-08-COLSYN	TLC	IV
Edulcorants artificiels	AS315-07-EDUSYN	Référence TLC	IV
Edulcorants artificiels	AS315-07-EDUSYN	Usuelle TLC	IV
Acide Ascorbique (L)	AS313-13-ALASCO	Méthode de référence: Spectrofluorimétrie	IV
Acide ascorbique (L)	AS313-13-ALASCO	Méthode usuelle: TLC + Spectrophotométrie	Eliminer
Cendre	AS2-04-CENDRE	gravimétrie	I
Brome	AS323-03-BORE	Spectrophotométrie	IV
Bromure Total	AS321-01-BROTOT	Colorimétrie	IV
Cadmium	AS322-10-CADMIU	Spectrométrie d'absorption atomique	IV
Calcium	AS322-04-CALCIU	Spectrométrie d'absorption atomique	II
Chlorures	SA321-02-CHLORU	Electrode Specifique	II
Caractéristiques Chromatiques	AS2-07-CACHR2	Méthode usuelle	IV
Acide citrique	AS313-08-ACICHI	Oxydation, Iodométrie	IV
Acide citrique	AS313-09-ACIENZ	Enzymatique	II
Cuivre	AS322-06-CUIVRE	Spectrométrie d'absorption atomique	IV
Derivés cyanés	AS315-06-DERCYA	Colorimétrie	II
Masse volumique à 20°C	AS2-01-MASVOL	Méthode de référence: pycnométrie	I

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Masse volumique à 20°C	AS2-01-MASVOL	Méthode usuelle: aerométrie	IV
Masse volumique à 20°C	AS2-01-MASVOL	Méthode usuelle: densimétrie (balance hydrostatique)	I
Détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés, du sucre de raisin et des vins par ² H-RMN	AS311-05-ENRRMN	SNIF NMR	I
Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation	AS4-02-RECANT	HPLC	IV
Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation	AS4-02-RECANT	acides sorbique, benzoïque, p-chlorobenzoïque	IV
Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation	AS4-02-RECANT	acide p-hydroxybenzoïque, azide de sodium	IV
Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation	AS4-02-RECANT	GC pyrocarbonate d'éthyl	IV
Détermination du rapport isotopique de l'éthanol	AS312-06-ETHANO	Méthode de référence SNIF NMR	II
Diéthylène glycol	AS315-09-DIEGLY	Chromatographie gazeuse	IV
Différentiation des mistelles et des vins de liqueur doux	AS5-01-DIFMIS		IV
Extrait sec total	AS2-03-EXTSEC	Méthode de référence: gravimétrie	I
Extrait sec total	AS2-03-EXTSEC	Méthode usuelle: densimétrie	IV
Acétate d'éthyle	AS315-02-ACEETH	Méthode de référence: Chromatographie gazeuse	IV
Acétate d'éthyle	AS315-02-ACEETH	Méthode usuelle: Titrimétrie	IV
Carbamate d'éthyle	AS315-04-CARETH	Chromatographie gazeuse-SM	II
Evaluation de la teneur en sucres des moûts, des moûts concentrés et du raisin par réfractométrie	AS2-02-SUCREF	refractométrie	I
Index Folin-Ciocalteu	AS2-10-INDFOL	Colorimétrie	IV
Glycerol	AS312-05-GLYENZ	Enzymatique	IV
Glycerol et 2,3- butanediol	AS312-04-GLYBUT	Méthode de référence: Colorimétrie	IV
Hydroxyméthylfurfural	AS315-05-HYDMFF	Colorimétrie	IV
Hydroxyméthylfurfural	AS315-05-HYDMFF	HPLC	IV
Fer	AS322-05-FER	Méthode de référence: Spectrométrie d'absorption atomique	IV
Fer	AS322-05-FER	Méthode usuelle: Colorimétrie	IV
Acide lactique	AS313-06-ALACHI	Colorimétrie	Eliminer
Acide lactique	AS313-07-ALAENZ	Enzymatique	II
Magnesium	AS322-07-MAGNES	Spectrométrie d'absorption atomique	II

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Acide malique (D): méthode Enzymatique	AS313-12-ADMENZ	Enzymatique	II
Acide malique (D): faible concentration	AS313-12-ADMEZ2	Enzymatique	IV
Acide malique (L): méthode enzymatique	AS313-11-ALMENZ	Enzymatique	II
Acide malique Total: méthode usuelle	AS313-10-AMALTO	Colorimétrie	IV
Diglycoside de malvidol	AS315-03-DIGMAL	Colorimétrie	IV
Mercure	AS323-06-MERCUR	Spectrométrie d'absorption atomique	IV
Methanol	AS312-03-METHAN	Référence : Chromatographie gazeuse	IV
Methanol	AS312-03-METHAN	Méthode usuelle	IV
Mouillage - rapport isotopique 18O/16O	AS2-09-MOUO18	Spectrométrie de masse (rapport isotopique)	II
Azote Total	AS323-02-AZOTOT	Méthode Kjeldhal's	IV
Azote Total - méthode Dumas	AS323-02-AZOTDU	méthode Dumas	II
Ochratoxine A	AS315-10-OCHRAT	HPLC	II
Acides Organiques	AS313-04-ACIORG	HPLC	IV
Acides Organiques	AS313-19-ACORG2	électrophorèse capillaire	II
Potentiel d'oxidation-reduction	AS2-06-POTOXY	Potentiométrie	IV
pH	AS313-15-PH	Potentiométrie	I
Phosphore total	AS321-04-PHOTOT	Colorimétrie	IV
Potassium	AS322-02-POTASS	Méthode de référence: Spectrométrie d'absorption atomique	II
Potassium	AS322-02-POTASS	Méthode usuelle: photométrie de flamme	III
Potassium	AS322-02-POTASS	Gravimétrie	Eliminer
Argent	AS322-09-ARGENT	Spectrométrie d'absorption atomique	IV
Sodium	AS322-03-SODIUM	Méthode de référence: Spectrométrie d'absorption atomique	II
Sodium	AS322-03-SODIUM	Méthode usuelle: photométrie de flamme	III
Acide sorbique	AS313-14-ACISOR	Spectrophotométrie	IV
Acide sorbique	AS313-14-ACISOR	Chromatographie gazeuse	IV
Acide sorbique	AS313-14-ACISOR	TLC	IV
Glucose et fructose	AS311-02-GLUFRU	Enzymatique	II
Glucose et fructose	AS311-07-GLCFR2	pHmétrie	III
Glucose, fructose et saccharose	AS311-08-SACCHA	pHmétrie	IV
Sulfates	AS321-05-SULFAT	Méthode de référence: gravimétrie	II
Sulfates	AS321-05-SULFAT	Méthode usuelle: Titrimétrie	Eliminer

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Sucres: Sucres réducteurs	AS311-01-SUCRED	Méthode de référence clarification: Titrimétrie (défécation)	Eliminer
Sucres: Sucres réducteurs	AS311-01-SUCRED	Méthode usuelle clarification: Titrimétrie (défécation)	IV avec remplacement du terme sucres réducteurs par « <u>substances réductrices</u> »
Sucres: Sucres réducteurs	AS311-01-SUCRED	Méthode de référence	Eliminer
Dioxyde de soufre - vin	AS323-04-DIOSOU	Titrimétrie (référence)	II
Dioxyde de soufre - vin	AS323-04-DIOSOU	Iodométrie (rapide)	IV
Dioxyde de soufre - vin	AS323-04-DIOSOU	Méthode moléculaire	IV
Dioxyde de soufre - jus de raisin	AS323-05-SO2JUS	Titrimétrie	IV
Acide tartrique	AS313-05-ACITAR	Méthode de référence: gravimétrie	IV
Acide tartrique	AS313-05-ACITAR	Méthode usuelle: Spectrophotométrie	Eliminer
Mesure de la turbidité	AS2-08-TURBID	néphélométrie	IV
Zinc	AS322-08-ZINC	Spectrométrie d'absorption atomique	IV

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉESOLUTION OIV/OENO 392/2009

DISCUSSION SUR LES INCERTITUDES ET LES TAUX DE RECOUVREMENT

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

Vu l'article 2, paragraphe 2 de l'Accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition de la Sous-Commission Méthodes d'analyse,

CONSIDÉRANT l'existence d'un large consensus scientifique sur le principe de correction du taux de recouvrement et sa déclaration transparente, l'incidence considérable qu'un résultat, corrigé ou non du taux de recouvrement, peut toutefois avoir pour d'autres parties prenantes en dehors de la communauté analytique immédiate,

CONSIDÉRANT les travaux de nombreuses organisations internationales en matière de correction du taux de recouvrement,

RECOMMANDE qu'un autre sous-groupe, étudie l'incidence de la correction du taux de recouvrement (et de l'incertitude de mesure) sur l'interprétation et la fixation de limites, rapporte et fasse des recommandations sur la base de la gestion du risque et des principes statistiques, prenant en compte les incertitudes de l'estimation du taux de recouvrement et la mesure de l'incertitude.

DÉCIDE d'adopter les recommandations et le texte suivants relatifs à la correction du taux de recouvrement, qui doivent être inclus dans le recueil des méthodes d'analyse de l'OIV

Taux de recouvrement

"L'OIV recommande la procédure suivante en ce qui concerne les comptes-rendus relatifs à la taux de recouvrement de résultats analytiques.

- o Les résultats analytiques doivent être corrigés, le cas échéant, sur la base d'un taux de recouvrement et qui doivent être signalée si tel est le cas.
- o Si un résultat a été corrigé en fonction du taux de recouvrement, il convient de citer la méthode de calcul du taux de recouvrement. Le taux de recouvrement doit être indiqué dans la mesure du possible.
- o Lors de l'établissement de dispositions pour des normes, il conviendra de préciser si le résultat obtenu à l'aide d'une méthode utilisée pour l'analyse dans le cadre de contrôles de conformité sera ou non exprimé avec correction en fonction du taux de recouvrement."

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 296/2009

DOSAGE DU 2,4,6-TRICHLOROANISOLE RELARGABLE DANS LE VIN PAR LES BOUCHONS DE LIÈGE ¹

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin

Sur proposition de la Sous-Commission des méthodes d'analyse,

DECIDE: d'introduire dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts la méthode de type IV suivante :

Titre	Type de Méthode
DOSAGE DU 2,4,6-TRICHLOROANISOLE RELARGABLE DANS LE VIN PAR LES BOUCHONS DE LIÈGE	IV

1 DOMAINE D'APPLICATION :

Contrôle de qualité des bouchons de liège destinés à fermer les bouteilles de vin.

La méthode pour la détermination du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) relargable par les bouchons mesure le TCA libéré par un échantillon de bouchons macéré dans une solution hydroalcoolique. L'objectif de cette méthode est d'évaluer le risque de libération par le lot de bouchons analysés et de fournir une méthode visant le contrôle de qualité des bouchons de liège.

2 PRINCIPE

La méthode vise à simuler les phénomènes de migration du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) susceptibles de se produire entre le bouchon de liège et le vin en bouteilles. Les bouchons de liège sont mis à macérer dans un vin ou une solution hydroalcoolique jusqu'à l'obtention d'un équilibre. Le TCA de l'espace de tête d'une partie aliquote du macérât est prélevé par la technique de microextraction en phase solide (SPME), puis analysé par chromatographie en phase gazeuse, avec détection par spectrométrie de masse (GC/MS) ou par capture d'électrons (GC/ECD).

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

3 REACTIFS ET PRODUITS

- 3.1 Vin blanc de titre alcoométrique compris entre 10 et 12% vol. Peut être remplacé par une solution hydroalcoolique de titre alcoométrique de 12 % vol. Le vin et/ou la solution hydroalcoolique doivent être exempts de TCA.
- 3.2 Chlorure de sodium, pureté $\geq 99,5\%$.
- 3.3 2,4,6-trichloroanisole (TCA)-d5 pureté $\geq 98\%$ pour GC/MS ; 2,6-dibromoanisole ou 2,3,6-trichloroanisole pureté $\geq 99\%$ pour GC/ECD
- 3.4 2,4,6-trichloroanisole (TCA) pureté $\geq 99,0\%$
- 3.5 Ethanol absolu
- 3.6 Eau désionisée pure, exempte de TCA, type II selon la Norme ISO EN 3696.
- 3.7 Solution hydroalcoolique à 12% vol.
- Préparée à partir d'éthanol absolu (3.5) et d'eau désionisée pure exempte de TCA (3.6).
- 3.8 Solution mère d'étalon interne (500 mg/L). Ajouter 0.050 g soit de 2,4,6-trichloroanisole d5 soit de 2,6-dibromoanisole ou de 2,3,6 trichloroanisole (3.3) à environ 60 mL d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 100 mL avec de l'éthanol absolu (3.5). Se conserve en bouteille de verre pourvue d'un opercule métallique ou en verre.
- 3.9 Solution intermédiaire d'étalon interne (5,0 mg/L)
- Ajouter 1 mL d'une solution soit de 2,4,6-trichloroanisole d5 soit de 2,6- dibromoanisole ou 2,3,6 trichloroanisole à 500 mg/L (3.8) à environ 60 mL d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 100 mL avec de l'éthanol absolu (3.5). Se conserve en bouteille de verre pourvue d'un opercule métallique métallique ou en verre.
- 3.10 Solution d'étalon interne (2,0 $\mu\text{g/L}$)
- Ajouter 40 μl d'une solution soit de 2,4,6-trichloroanisole d5 soit de 2,6- dibromoanisole ou 2,3,6 trichloroanisole à 5,0 mg/L (3.9) à environ 60 mL d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 100 mL avec de l'éthanol absolu (3.5). Se conserve en bouteille de verre pourvue d'un opercule métallique-métallique *ou en verre*.
- 3.11 Solution mère d'étalon TCA (40 mg/L)
- Ajouter 0,020g de 2,4,6-trichloroanisole à environ 400 ml d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 500 ml avec d'éthanol absolu (3.5).
- 3.12 Solution intermédiaire d'étalon TCA (80 $\mu\text{g/L}$)
- Ajouter 1 ml d'une solution de 2,4,6-trichloroanisole à 40 mg/L (3.11) à environ 400 ml d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 500 ml avec d'éthanol absolu (3.5).
- 3.13 Solution intermédiaire d'étalon TCA (160 ng/L)
- Ajouter 1 ml d'une solution de 2,4,6-trichloroanisole à 80 $\mu\text{g/L}$ (3.12) à environ 400 ml d'eau désionisée pure (3.6). Après dissolution, ajuster le volume à 500 ml avec d'eau désionisée pure (3.6)
- 3.14 Utiliser la technique des ajouts dosés pour construire la gamme étalon pour le TCA. On peut utiliser pour cela les solutions d'étalonnage dans une gamme de 0,5 ng/L à 50 ng/L. Ainsi, faire les ajouts dosés d'une solution de 2,4,6-trichloroanisole à 160 ng/L (3.13) à 6 ml d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 50 ml avec d'eau désionisée pure (3.6). Réévaluer périodiquement la courbe de calibration ainsi obtenue ; la réévaluer également lors de chaque changement majeur au niveau du GC/MS ou GC/ECD.
- 3.15 : Gaz vecteur Hélium, de pureté chromatographique ($\geq 99,9990\%$).

4. MATERIEL

- 4.1 Verrerie de laboratoire
- 4.1.1 Fiole jaugée de 100 ml
- 4.1.2 Microseringue de 100 μl
- 4.1.3 Flacon de verre, à large col, avec une capacité adaptée à la taille de l'échantillon et fermant avec un bouchon en verre, métallique ou en matériau qui ne fixe pas le TCA.
- 4.1.4 Flacon de verre de 20 mL fermant avec une capsule perforée et un opercule à face téflonée.
- 4.2 Système de microextraction en phase solide (SPME) avec fibre revêtue d'un film de polydiméthylsiloxane de 100 μm d'épaisseur
- 4.3 Système de chauffage pour flacon (4.1.4)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

- 4.4 Système d'agitation pour flacon (4.1.4)
- 4.5 Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un injecteur "split splitless" et d'un détecteur à spectromètre de masse (SM) ou à capture d'électrons (CE)
- 4.6 Système d'acquisition des données informatisé
- 4.7 Eventuellement, système pour prélèvement et injection automatique fonctionnant avec un système SPME.
- 4.8 Colonne capillaire de phase stationnaire apolaire, type phénylméthylpolysiloxane (ex : Poly 5% phenyl methyl polysiloxane, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de film) ou équivalent.

5. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Les bouchons sont placés entiers dans un flacon en verre fermé. La capacité du flacon (4.1.3), de même que la quantité de vin ou solution hydroalcoolique (3.1 ou 3.7), doivent être choisis en fonction de la taille de l'échantillon, en assurant que les bouchons soient totalement contenus et immergés dans le flacon de macération.

Exemple 1 : 20 bouchons (45x24) mm, dans un flacon de 1 L ;

Exemple 2 : 50 bouchons (45x24) mm, dans un flacon de 2 L .

L'essentiel du TCA libéré en macération de groupes de bouchons l'est généralement par un pourcentage très faible de ces bouchons. Afin d'obtenir la meilleure représentativité possible d'un lot de bouchon, il convient d'effectuer un nombre d'analyses approprié selon les règles d'échantillonnage et du risque encouru vis-à-vis de la contamination du vin.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Extraction

Après macération durant (24 ± 2) heures dans les conditions de température ambiante du laboratoire, le macérât est homogénéisé par retournement du récipient.

Une partie aliquote de 10 ml de solution de macération (5) est transférée en flacon de verre (4.1.4).

Pour augmenter l'efficacité de l'extraction et la conséquente sensibilité de la méthode, il peut être ajoutée une quantité d'environ 1 g de chlorure de sodium (3.2). 50 µl de solution d'étalon interne à 2,0 µg/L (3.10) sont immédiatement ajoutés, puis le flacon est fermé à l'aide d'une capsule métallique percée munie d'un opercule silicone/téflonné. La capsule est sertie.

Le contenu du flacon est homogénéisé 10 minutes par agitation à l'aide d'un système d'agitation (4.4) ou par le système automatique (4.7).

Le flacon contenant l'échantillon est placé dans le système de chauffage (4.3) réglé à 35 °C ± 2 °C et maintenu sous agitation (4.4). L'extraction de l'espace de tête est réalisée par le système SPME (4.2) pendant au moins 15 minutes.

6.2 Analyse

La fibre est ensuite désorbée à 260°C pendant au moins 2 minutes dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse, mode splitless (4.5). La séparation s'effectue à l'aide d'une colonne capillaire de phase stationnaire apolaire (type phénylméthylpolysiloxane ou équivalent). Le gaz vecteur est l'hélium à débit constant de 1 mL/min. Gradient de température 35°C (3 min) à 265°C (15°C/min) donné à titre d'exemple.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

6.3 Détection et quantification

La détection s'effectue par spectrométrie de masse avec sélection d'ions spécifiques pour le 2,4,6-trichloroanisole (ions m/z 195, 210, 212) et quantifié sur l'ion m/z 195 et l'étalon interne 2,4,6-trichloroanisole d_5 (ions m/z 199, 215, 217) et quantifié sur l'ion m/z 215. Pour la détermination par ECD, identifier l'analyte et l'étalon interne (2,6-dibromoanisole ou 2,3,6 trichloroanisole) dans le chromatogramme, en comparant les temps de rétention des pics correspondants de l'échantillon à ceux des pics des solutions d'étalon.

7. CALCULS

La surface du pic chromatographique obtenu pour le 2,4,6-trichloroanisole est corrigée par la surface obtenue pour le pic chromatographique de l'étalon interne. La teneur en 2,4,6- trichloroanisole de chaque échantillon est obtenue à l'aide d'une courbe étalon. Les points de cette courbe sont obtenus en traçant les réponses relatives de 2,4,6-trichloroanisole/étalon interne, obtenues pour des solutions hydroalcooliques (3.7) contenant des concentrations connues de 2,4,6-trichloroanisole, en fonction des concentrations de ces solutions (3.14).

Les résultats sont donnés en ng/L de TCA présent dans la solution de macération, arrondis à 0,1 ng/L

8. CARACTERISTIQUE DE LA METHODE

À titre indicatif, le seuil de détection de l'analyse des macérations doit être inférieur à 0,5 ng/L, et le seuil de quantification proche de 1 ng/L. Le coefficient de variation est inférieur à 5% pour 5 ng/L, lorsque l'étalon interne choisi est l'analogue deutéré TCA d_5 .

Un essai interlaboratoire a été réalisé afin de valider la méthode.

Cet essai interlaboratoire n'a pas été conduit selon le protocole OIV et les paramètres de validation sont mentionnés dans le FV 1224.

9. BIBLIOGRAPHIE

HERVÉ E., PRICE S., BURNS G., Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural corks. *ASEV Annual Meeting*. 1999.

Norme ISO 20752:2007. Bouchons de liège – Dosage du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) relargable.

FV OIV 1224 : Résultats de l'analyse collaborative Ring test 3-TCA SPME

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 345/2009

DOSAGE DU GLUTATHION DANS LES MOÛTS ET LES VINS PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition de la Sous-Commission « Méthodes d'analyse »,

DECIDE de compléter l'annexe A du *Recueil International des méthodes d'analyse* par la méthode de type IV suivante:

Titre	Type de la méthode
Dosage du glutathion dans les moûts et les vins par électrophorèse capillaire	IV

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage du glutathion dans les moûts et les vins dans une gamme de concentration de 0 à 40 mg/L. Elle utilise l'électrophorèse capillaire (EC) couplée à une détection fluorimétrique (LIF).

2. Principe

La méthode utilisée, qui procède par électrophorèse capillaire, est adaptée de celle mise au point par Noctor et Foyer (1998) pour doser les thiols non volatils dans les feuilles de peuplier par HPLC couplée à une détection fluorimétrique.

La séparation des solutés d'un mélange par électrophorèse capillaire est obtenue par migration différentielle dans un électrolyte. Le capillaire est rempli avec cet électrolyte.

L'échantillon à séparer est injecté à l'une des extrémités du capillaire. Sous l'action du champ électrique généré par les électrodes plongées dans l'électrolyte, les solutés se séparent par différence de vitesse de migration et sont détectés à proximité de l'autre extrémité du capillaire sous forme de pics. Dans des conditions opératoires données, les temps de migration constituent un critère d'identification des espèces chimiques et la surface du pic est proportionnelle à la quantité injectée.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

3. Produits et réactifs

3.1 Liste des produits

- 3.1.1 glutathion (GSH, > 98 %),
- 3.1.2 dithiothréitol (DTT, >99 %),
- 3.1.3 phosphate de sodium monobasique anhydre (NaH_2PO_4 , >99 %)
- 3.1.4 phosphate de sodium dibasique anhydre (Na_2HPO_4 , >99 %)
- 3.1.5 acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonic (CHES, >98 %),
- 3.1.6 monobromobimane (MBB, 97 %)
- 3.1.7 sel de sodium d'acide d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA, >99 %)
- 3.1.8 hydroxyde de sodium
- 3.1.9 acide chlorhydrique (35 %)
- 3.1.10 acétonitrile (99,5 %)
- 3.1.11 eau ultrapure de résistivité >18 M Ω .cm.

3.2 Liste des solutions

Chacune des solutions est homogénéisée avant toute utilisation

3.2.1 Tampon électrophorétique : tampon phosphate, 50 mM, pH 7

Ce tampon est préparé à partir de deux solutions A et B

3.2.1.1 Solution A : 3 mg de phosphate monobasique anhydre (3.1.3) repris dans 250 mL d'eau ultra pure (3.1.11)

3.2.1.2 Solution B : 3,55 mg de phosphate dibasique anhydre (3.1.4) repris dans 250 mL d'eau ultra pure (3.1.11)

Le tampon phosphate est obtenu par addition de 40 ml de la solution A (3.2.1.1) et 210 mL de la solution B (3.2.1.2), complété à 500 mL par de l'eau ultra pure (3.1.11). Le pH du tampon est alors ajusté à 7 par de l'acide chlorhydrique (3.1.9).

3.2.2 Solution de monobromobimane (MBB), 50 mM

25 mg de monobromobimane (MBB) (3.1.6) sont repris par 1850 μL d'acétonitrile (3.1.10).

Conservé à - 20 °C à l'abri de la lumière, le réactif est stable durant trois mois.

3.2.3 Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.

0,4 g d'hydroxyde de sodium (3.1.8) sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml et repris par 100 mL d'eau ultra pure (3.1.11).

3.2.4 Solution d'hydroxyde de sodium 5 M.

20 g d'hydroxyde de sodium (3.1.8) sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml et repris par 100 mL d'eau ultra pure (3.1.11).

3.2.5 Tampon CHES : 0,5 M, pH 9,3

2,58 g d'acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonic (CHES) (3.1.5) sont dissous dans environ 20 ml d'eau ultra pure (3.1.11). Le pH du tampon est ajusté à 9,3 par addition d'hydroxyde de sodium 5 M (3.2.4) puis le volume est ajusté à 25 ml par de l'eau ultra pure (3.1.11). Ce tampon est réparti dans des tubes de 1,5 mL (type Eppendorf) à raison de 1 ml par tube.

La solution aqueuse de CHES, placée à - 20°C, peut être conservée durant plusieurs mois.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

3.2.6 Solution de dithiothréitol (DTT), 10 mM

15,4 mg de dithiothréitol (3.1. 2) sont dissous dans 10 mL d'eau ultra pure (3.1.11) puis cette solution est répartie dans des tubes de 1,5 mL (type Eppendorf) à raison de 1 ml par tube. La solution aqueuse de DTT, placée à - 20°C, peut être conservée durant plusieurs mois.

4. Appareillage

4.1 L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire munie d'un injecteur de type hydrostatique est couplée à un détecteur de fluorescence induite par laser ayant une longueur d'onde d'excitation proche de la longueur d'onde d'absorption de l'adduit MBB-GSH : ex = 390 nm (par exemple, détecteur Zetalif).

4.2 Le capillaire

La longueur totale du capillaire en silice non greffée est de 120 cm, la longueur efficace est de 105 cm, le diamètre interne est de 30 µm.

5. Préparation des échantillons

La méthode de dosage utilisée met en jeu la dérivation des fonctions SH par le monobromobimane (MBB) (Radkowsky et Kosower, 1986). Les échantillons de moûts ou de vins bruts sont clarifiés par centrifugation avant d'être analysés. Les vins en bouteille sont analysés sans clarification préalable.

Préparation des échantillons :

Dans un tube de 1,5 mL (type Eppendorf) placer successivement :

- 200 µl d'échantillon,
- 10 µl de la solution de DTT (3.2.4) ; concentration finale 0,25 mM.
- 145 µl de CHES (3.2.5) ; concentration finale 179 mM.
- 50 µl de MBB (3.2.2) ; concentration finale 6,2 mM.

Après agitation du mélange réactionnel, la dérivation des fonctions thiols par le MBB nécessite 20 min d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante. Dans ces conditions analytiques, les dérivés MBB-SR ainsi formés sont peu stables ; le dosage par EC-LIF doit être effectué immédiatement après la période d'incubation.

6. Mode opératoire

6.1 Conditionnement du capillaire

Avant sa première utilisation et dès que les temps de migration augmentent, le capillaire (4.2) doit être conditionné de la façon suivante :

- 6.1.1. rinçage à l'hydroxyde de sodium 0,1 M (3.2.5) pendant 3 min,
- 6.1.2. rinçage à l'eau ultra pure (3.1.12) pendant 3 min,
- 6.1.3. rinçage par le tampon phosphate électrophorétique (3.2.1) pendant 3 min.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

6.2 Conditions de migration

6.2.1 L'injection de l'échantillon est de type hydrostatique ; 3 s à 5 kPa.

Elle est suivie d'une injection de tampon électrophorétique (3.2.1) 50 mb afin d'améliorer la résolution des pics (Staking).

6.2.2 Analyse.

La tension de + 30 kV, appliquée tout au long de la séparation, génère un courant de 47 μ A. Ces conditions sont atteintes en 20 s. La séparation est effectuée à une température constante de 21°C.

6.2.3 Rinçage du capillaire

Le capillaire doit être rincé après chaque analyse successivement par :

- l'hydroxyde de sodium 0,1 M (3.2.3) pendant 3 min,
- l'eau ultra pure (3.1.12) pendant 3 min,
- le tampon phosphate électrophorétique (3.2.1) pendant 3 min.

7. Résultats

A la concentration finale utilisée dans l'échantillon, la présence de DTT durant la dérivation permet de stabiliser les fonctions thiols instables à pH alcalin et très facilement oxydables par les quinones, produits de l'auto-oxydation des composés phénoliques, mais ne rompt pas les ponts disulfures. En effet, dans ces conditions analytiques, la teneur en glutathion réduit (GSH) retrouvée dans un vin additionné ou non de glutathion oxydé (GSSG) à raison de 10 mg/L est strictement comparable (Figure 1). Cette méthode permet par conséquent de doser le glutathion sous sa seule forme réduite.

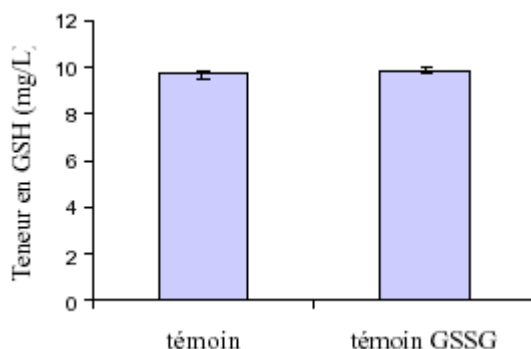


Figure 1 : Mise en évidence de la stabilité des ponts disulfures dans les conditions de dérivation décrites. (DTT, 0,25 mM final).

La figure 2 présente le profil électrophorétique d'un échantillon de moût de raisin blanc, cépage Sauvignon, dans lequel sont identifiés la cystéine, le glutathion, la N-acétyl-cystéine et le dioxyde de soufre. Le premier pic correspond aux réactifs en excès (DTT, MBB). La séparation des thiols non volatils est effectuée en moins de 20 minutes. Parmi tous les pics, seuls certains ont pu être identifiés (figure 2, A) (Newton et al., 1981). Ces thiols, hormis le dioxyde de soufre, sont généralement présents en quantités variables dans les baies de raisins (Cheynier et al., 1989), les fruits et les légumes (Mills et al., 2000).

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

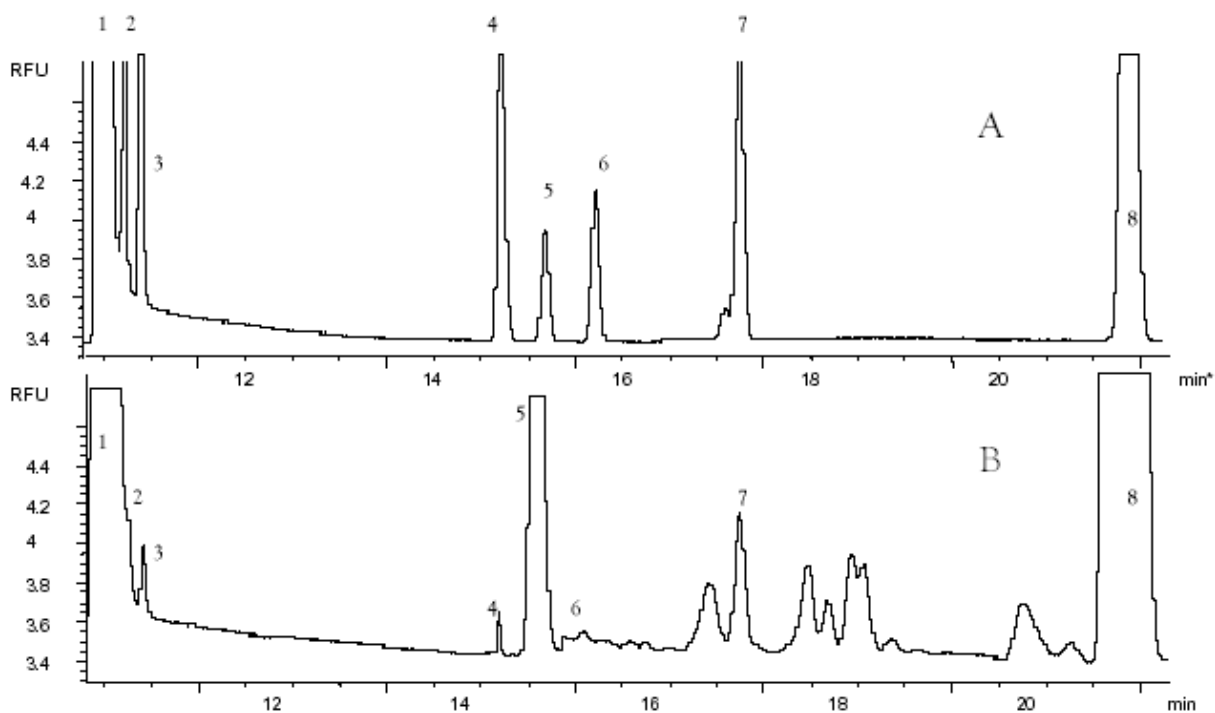


Figure 2: Exemple de séparation des thiols non volatils connus dans une solution HCl/EDTA (A) 1 et dans un moût de raisin (B): DTT ; 2 : homocystéine ; 3 : cystéine ; 4 : Cys-Gly ; 5 : GSH ; 6 : g Glu-Cys ; ,7 : NAC ; 8 : SO₂.

Dans ces conditions analytiques, les temps de rétention des adduits MBB-RS sont les suivants : MBB-homocystéine 10,40 min; MBB-cystéine 10,65 min, MBB-GSH 14,14 min ; MBB-NAC 15,41min ; MBB-SO₂ 18,58min.

8. Caractéristiques de la méthode

Certains éléments de validation internes ont été déterminés mais il ne s'agit pas d'une validation formelle selon le protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performances des méthodes d'analyse (OIV 6/2000)

Le vin est utilisé comme matrice pour réaliser les courbes d'étalonnage et les tests de répétabilité de chaque composé.

Chaque concentration est calculée à partir de la moyenne de trois déterminations obtenues en utilisant la droite de régression de la courbe d'étalonnage.

Les résultats sont exprimés en mg/L.

Les régressions linéaires et les coefficients de corrélation sont calculés selon la méthode des moindres carrés. Les solutions mères des différents thiols sont réalisées à partir d'une solution d'HCl/EDTA permettant de les conserver sans perte plusieurs jours à + 6°C. Des dilutions successives de ces solutions permettent d'estimer le seuil limite de détection dans le vin, pour un rapport signal sur bruit supérieur ou égal à trois.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

La gamme de linéarité est variable selon les thiols (Tableau 1).

Tableau 1 : gamme de linéarité, propriétés des régressions linéaires propres à chaque thiol en solutions préparées de façon identique à celle du glutathion

	Gamme de linéarité	Régression linéaire	Coefficient de corrélation
Homocystéine	0 - 15 mg/l	$Y = 0.459X - 0.231$	0,9987
Cystéine	0 - 15 mg/l	$Y = 0.374X - 0.131$	0,9979
Glutathion	0 - 40 mg/l	$Y = 0.583X - 0.948$	0,9966
N-acétyl-cystéine	0 - 10 mg/l	$Y = 0.256X - 0.085$	0,9982

Les conditions d'analyses permettent d'éliminer les interférences provoquées par les produits d'hydrolyse du MBB, contrairement à ce qui est signalé dans d'autres travaux (Ivanov et al., 2000).

La répétabilité de la méthode est calculée à partir de dix analyses d'un même échantillon de vin. Pour une concentration en thiols de 10 mg/l, le coefficient de variation est de 6,0 % pour le glutathion ; par ailleurs, il est de 3,2 % pour l'homocystéine, 4,8 % pour la cystéine, et 6,4 % pour la N-acétyl-cystéine.

La limite de détection du glutathion est de 20 µg/l, la limite de quantification est de 60 µg/l.

9. BIBLIOGRAPHIE

- Noctor, G. and C. Foyer, 1998. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione, *Analytical Biochemistry*, **264**, 98-110.
- Kosower, N.S., Kosower E. M., Newton G. L., and Ranney H. M., 1979. Bimane fluorescent labels: Labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76** (7), 3382-3386.
- Newton, G.L., R. Dorian, and R.C. Fahey, *Analysis of biological thiols: derivatisation with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography*. *Anal. Biochem.*, 1981. **114**: p. 383-387.
- Cheynier, V., J.M. Souquet, and M. Moutounet, 1989. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, **40** (4), 320-324.
- Mills, B.J., Stinson C. T., Liu M. C. and Lang C. A., 1997. Glutathione and cyst(e)ine profiles of vegetables using high performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Journal of food composition and analysis*, **10**, 90-101.
- Ivanov, A.R., I.V. Nazimov, and L. Baratova, 2000. Determination of biologically active low molecular mass thiols in human blood. *Journal of Chromatogr. A.*, **895**, 167-171.

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 346/2009

ANALYSE DES AMINES BIOGENES DES MOÛTS ET DES VINS PAR HPLC

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition de la Sous-Commission « Méthodes d'analyse »,

DECIDE de compléter l'annexe A du *Recueil International des méthodes d'analyse* par la méthode de type II suivante:

Titre	Type de la méthode
Analyse des amines biogènes des moûts et des vins par HPLC	II

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à l'analyse des amines biogènes dans les moûts et les vins :

Ethanolamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Histamine : jusqu'à 15 mg/L ;
Méthylamine : jusqu'à 10 mg/L ;
Sérotonine : jusqu'à 20 mg/L ;
Ethylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Tyramine : jusqu'à 20 mg/L ;
Isopropylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Propylamine : normalement absente ;
Isobutylamine : jusqu'à 15 mg/L ;
Butylamine : jusqu'à 10 mg/L ;
Tryptamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Phényléthylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Putrescine ou 1,4-diaminobutane : jusqu'à 40 mg/L ;
2-Méthylbutylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
3-Méthylbutylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Cadavérine ou 1,5-diaminopentane : jusqu'à 20 mg/L ;
Hexylamine : jusqu'à 10 mg/L.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

2. DEFINITION

Les amines biogènes dosées sont :

Ethanolamine : C_2H_7NO - CAS [141 - 43 - 5]

Histamine : $C_5H_9N_3$ - CAS [51 - 45 - 6]

Méthylamine : CH_5N - CAS [74 - 89 - 5]

Sérotonine : $C_{10}H_{12}N_2O$ - CAS [153 - 98 - 0]

Ethylamine : C_2H_7N - CAS [557 - 66 - 4]

Tyramine : $C_8H_{11}NO$ - CAS [60 - 19 - 5]

Isopropylamine : C_3H_9N - CAS [75 - 31 - 0]

Propylamine : C_3H_9N - CAS [107 - 10 - 8]

Isobutylamine : $C_4H_{11}N$ - CAS [78 - 81 - 9]

Butylamine : $C_4H_{11}N$ - CAS [109 - 73 - 9]

Tryptamine : $C_{10}H_{12}N_2$ - CAS [61 - 54 - 1]

Phényléthylamine : $C_8H_{11}N$ - CAS [64 - 04 - 0]

Putrescine ou 1,4-diaminobutane : $C_4H_{12}N_2$ - CAS [333 - 93 - 7]

2-Méthylbutylamine : $C_5H_{13}N$ - CAS [96 - 15 - 1]

3-Méthylbutylamine : $C_5H_{13}N$ - CAS [107 - 85 - 7]

Cadavérine ou 1,5-diaminopentane : $C_5H_{14}N_2$ - CAS [1476 - 39 - 7]

1,6-Diaminohexane : $C_6H_{16}N_2$ - CAS [124 - 09 - 4]

Hexylamine : $C_6H_{15}N$ - CAS [111 - 26 - 2]

3. PRINCIPE

Les amines biogènes sont directement dosées par HPLC à l'aide d'une colonne C_{18} après dérivation à l'O-phthaldialdéhyde (OPA) et détectés par fluorimétrie.

4. REACTIFS ET PRODUITS

- 4.1 Eau ultra pure de résistivité $\geq 18M\Omega cm$;
- 4.2 Di-sodium hydrogénophosphate dihydrate - pureté $\geq 99\%$;
- 4.3 Acétonitrile - Minimum de transmission à 200 nm - pureté $\geq 99\%$;
- 4.4 O-phthaldialdéhyde (OPA) - Application pour fluorescence - pureté $\geq 99\%$;
- 4.5 Di-sodium tétraborate décahydrate - pureté $\geq 99\%$;
- 4.6 Méthanol - pureté $\geq 99\%$;
- 4.7 Acide chlorhydrique 32 % ;
- 4.8 Hydroxyde de sodium en pastilles - pureté $\geq 99\%$;
- 4.9 Ethanolamine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.10 Histamine dichlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.11 Ethylamine chlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.12 Sérotonine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.13 Méthylamine chlorhydrate - Pureté $\geq 98\%$;
- 4.14 Tyramine chlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.15 Isopropylamine pureté $\geq 99\%$;
- 4.16 Butylamine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.17 Tryptamine chlorhydrate - pureté $\geq 98\%$;
- 4.18 Phényléthylamine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.19 Putrescine dichlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.20 2-Méthylbutylamine - Pureté $\geq 98\%$;
- 4.21 3-Méthylbutylamine - Pureté $\geq 98\%$;
- 4.22 Cadavérine dichlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.23 1-6-Diaminohexane - Pureté $\geq 97\%$;

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

- 4.24 Héxylamine - Pureté $\geq 99\%$;
4.25 Azote (impuretés maximales : $\text{H}_2\text{O} \leq 3 \text{ mg/L}$; $\text{O}_2 \leq 2 \text{ mg/L}$; $\text{C}_n\text{H}_m \leq 0.5 \text{ mg/L}$) ;
4.26 Hélium (impuretés maximales : $\text{H}_2\text{O} \leq 3 \text{ mg/L}$; $\text{O}_2 \leq 2 \text{ mg/L}$; $\text{C}_n\text{H}_m \leq 0.5 \text{ mg/L}$).

Préparation des solutions réactives :

4.27 Préparation des éluants

Solution A phosphate : sur une balance (5.27), dans un bécher de 50 mL (5.5), peser 11,12 g \pm 0,01 g de phosphate disodique (4.2). Transvaser dans une fiole jaugée de 2 litres (5.9), ajuster à 2 litres avec de l'eau déminéralisée (4.1). Homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique (5.30), filtrer sur membrane 0,45 μm (5.17). Mettre dans la bouteille de 2 litres (5.12)

Solution B : l'acétonitrile (4.3) est directement utilisé.

4.28 Solution d'OPA - Préparation journalière

Peser dans une fiole de 50 mL (5.7) sur la balance de précision (5.27), 20 mg \pm 0,1 mg d'OPA (4.4). Ajuster à 50 mL avec du méthanol (4.6). Homogénéiser.

4.29 Préparation du tampon borate (4.29) - Préparation hebdomadaire

Peser 3,81 g \pm 0,01 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (4.5) dans un bécher de 25 mL (5.6), sur la balance de précision (5.27). Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8), ajuster à 100 mL avec de l'eau déminéralisée (4.1). Homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique (5.30), transvaser dans un bécher de 150 mL (5.4), ajuster à pH 10,5 à l'aide du pHmètre (5.28 et 5.29) avec de la soude 10N (4.8).

4.30 Solution d'acide chlorhydrique à 0,1M : dans une fiole jaugée de 2 L (5.9), mettre un peu d'eau déminéralisée (4.1). Ajouter 20 mL d'acide chlorhydrique (4.7) à l'aide d'une pipette automatique de 10 mL (5.24 et 5.25)

4.31 Solution de calibration dans l'acide chlorhydrique 0.1 N

Concentration indicative de la solution de calibration, peser à $\pm 0.1 \text{ mg}$

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

			concentration indicative finale dans le mélange étalon en mg/L
Ethanolamine			5
Histamine			5
Méthylamine			1
Sérotonine			20
Ethylamine			2
Tyramine			7
Isopropylamine			4
Propylamine			2.5
Isobutylamine			5
Butylamine			5
Tryptamine			10
Phényléthylamine			2
Putrescine			12
2-Méthylbutylamine			5
3-Méthylbutylamine			6
Cadavérine			13
1.6-Diaminohexane			8
Hexylamine			5

La concentration réelle de la solution de calibration est consignée avec le numéro de lot des produits utilisés.

Certains amines biogènes sont sous forme de sel, il faut tenir compte du poids du sel pour déterminer le poids réel de l'amine biogène.

La solution mère est faite dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8).

La solution fille est faite dans une fiole jaugée de 250 mL (5.10).

4.32 Standard interne 1,6 Diaminohexane

Peser exactement 119 mg dans un erlenmeyer de 25 mL (5.1) sur une balance (5.27).

Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8). Ajuster au trait de jauge avec l'acide chlorhydrique 0.1 N (4.30) ;

4.33 2-Mercaptoéthanol - Pureté \geq 99 %.

5. APPAREILLAGE

- 5.1 Erlenmeyers de 25 mL ;
- 5.2 Erlenmeyers de 250 mL ;
- 5.3 Béchers de 100 mL ;
- 5.4 Béchers de 150 mL ;
- 5.5 Bécher de 50 mL ;
- 5.6 Bécher de 25 mL ;
- 5.7 Fioles jaugées de 50 mL ;

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

- 5.8 Fioles jaugées de 100 mL;
- 5.9 Fioles jaugées de 2 000 mL;
- 5.10 Fiole jaugée de 250 mL;
- 5.11 Bouteilles de 1 litre;
- 5.12 Bouteille de 2 litres;
- 5.13 Flacons de 2 mL à vis adaptés au passeur d'échantillons;
- 5.14 Seringue de 50 mL;
- 5.15 Aiguille;
- 5.16 Porte filtre;
- 5.17 Membrane de 0,45 µm en cellulose;
- 5.18 Membrane de 0,8 µm en cellulose;
- 5.19 Membrane de 1,2 µm en cellulose;
- 5.20 Membrane de 5 µm en cellulose;
- 5.21 Préfiltre en cellulose;
- 5.22 Pipette automatique de 1 mL;
- 5.23 Pipette automatique de 5 mL;
- 5.24 Pipette automatique de 10 mL
- 5.25 Cônes pour pipette automatique de 10 mL, 5 mL et 1 mL;
- 5.26 Système de filtration;
- 5.27 Balances pour des pesées de 0 à 205 g à ± 0,01 mg;
- 5.28 pHmètre;
- 5.29 Electrode;
- 5.30 Agitateur magnétique
- 5.31 Pompe HPLC;
- 5.32 Passeur-préparateur équipé d'un four

Note : le four est indispensable, si un passeur-préparateur est utilisé pour injecter plusieurs échantillons à la suite, cette opération peut aussi se faire manuellement mais les résultats risquent d'être moins précis ;

- 5.33 Boucle d'injection;
- 5.34 Colonne C₁₈ de 5 µm, 250 mm × 4 (qui doit conduire à un chromatogramme proche de celui présenté en annexe B);
- 5.35 Détecteur fluorimétrique;
- 5.36 Intégrateur;
- 5.37 Tube en verre borosilicaté de 15 mL avec bouchon et obturateur recouvert de PTFE.

6. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons sont préalablement dégazés à l'azote (4.25).

6.1 Filtration

Filtrer environ 120 mL d'échantillon sur membrane:

- pour un vin : 0.45µm (5.17),
- pour un moût ou un vin non clarifié, empiler les filtres dans l'ordre suivant, l'échantillon étant poussé par le dessus : 0,45µm (5.17) + 0,8 µm (5.18) + 1,2 µm (5.19) + 5 µm (5.20) + préfiltre (5.21) +.

6.2 Préparation de l'échantillon

Mettre 100 mL d'échantillon (6.1) dans une fiole de 100 mL (5.8) ;

Ajouter 0.5 mL de 1-6-diaminohexane (4.32) à 119 mg/100 mL à l'aide d'une pipette automatique de 1 mL (5.21 et 25) ;

Prélever 5 mL d'échantillon à l'aide de la pipette (5.23 et 5.25) ; les verser dans un erlenmeyer de 25 mL (5.1) ;

Y ajouter 5 mL de méthanol (4.6) à l'aide de la pipette (5.23 et 5.25) ;

Homogénéiser par agitation ;

Transférer dans des flacons (5.13) ;

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Lancer la pompe HPLC (5.31) puis l'injection 1 µL (5.32 et 5.33).

6.3 Dérivatisation

Dans un tube en verre borosilicaté (5.37), verser 2 mL de solution d'OPA (4.28), 2 mL de tampon borate (4.29), 0,6 mL de 2-mercaptoéthanol (4.33). Boucher, agiter (5.30). Ouvrir et verser 0,4 mL d'échantillon. Boucher, agiter (5.30). **Injecter immédiatement, le dérivé n'étant pas stable.** Rincer immédiatement la vaisselle après injection, à cause de l'odeur.

Note : la dérivation peut être réalisée par un préparateur/injecteur automatique. Dans ce cas, il sera programmé pour s'approcher des proportions de la dérivation manuelle.

6.4 Nettoyage courant

Seringue (5.13) et aiguille (5.14) rincées à l'eau déminéralisée (4.1) après chaque échantillon ; Porte-filtre (5.16) rincé à l'eau chaude, puis MeOH (4.6). Laisser sécher à l'air.

7. MODE OPERATOIRE

Phase mobile (5.31)

- A : tampon phosphate (4.2) ;
- B : acétonitrile (4.3).

Gradient d'éluion :

temps (en min)	% A	% B
0	80	20
15	70	30
23	60	40
42	50	50
55	35	65
60	35	65
70	80	20
95	80	20

Note : le gradient peut être ajusté pour obtenir un chromatogramme proche de celui présenté en annexe B

Débit : 1 mL/min ;

Température de colonne 35°C (5.32) ;

Détecteur (5.35) : Exc = 356 nm, Em = 445 nm (5.30);

Etalonnage interne

La solution de calibration est injectée à chaque série ;
Calibration par standard interne ;

Calcul des facteurs de réponse :

$$RF = C_{cis} \times \text{surface } i / \text{surface } is \times C_{ci}$$

C_{ci} = concentration du composant dans la solution de calibration et

C_{cis} = concentration du standard interne dans la solution de calibration (1-6-diaminohexane).

Surface i = surface du pic du produit présent dans l'échantillon

Surface is = surface du pic du standard interne dans l'échantillon

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Calcul des concentrations :

$$C_{ci} = (XF \times \text{surface } i) / (\text{surface } is \times RF)$$

Surface i = surface du pic du produit présent dans l'échantillon

Surface is = surface du pic du standard interne dans l'échantillon

XF = quantité d'étalon interne ajoutée aux échantillons à analyser

$$XF = 119 \times 0.5/100 = 5.95.$$

8. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en mg/L avec un chiffre significatif après la virgule.

9. FIDELITE

	r (mg/L)	R (mg/L)
Histamine	$0.07x + 0.23$	$0.50x + 0.36$
Méthylamine	$0.11x + 0.09$	$0.40x + 0.25$
Ethylamine	$0.34x - 0.08$	$0.33x + 0.18$
Tyramine	$0.06x + 0.15$	$0.54x + 0.13$
Phényléthylamine	$0.06x + 0.09$	$0.34x + 0.03$
Diaminobutane	$0.03x + 0.71$	$0.31x + 0.23$
2-méthylbutylamine et 3-méthylbutylamine	$0.38x + 0.03$	$0.38x + 0.03$
Diaminopentane	$0.14x + 0.09$	$0.36x + 0.12$

Les détails de l'essai interlaboratoires portant sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe A.

10. AUTRES CARACTERISTIQUES DE L'ANALYSE

Influence de certains composants du vin : les acides aminés sortent au début de l'analyse et ne gênent pas la détection des amines biogènes.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) selon une étude intralaboratoire :

	LOD (en mg/L)	LOQ (en mg/L)
Histamine	0,01	0,03
Méthylamine	0,01	0,02
Ethylamine	0,01	0,03
Tyramine	0,01	0,04
Phényléthylamine	0,02	0,06
Diaminobutane	0,02	0,06
2-méthylbutylamine	0,01	0,03
3-méthylbutylamine	0,03	0,10
Diaminopentane	0,01	0,03

11. CONTROLE QUALITE

Des contrôles qualité peuvent être réalisés avec des matériaux de référence certifiés, des vins dont les caractéristiques sont issues d'un consensus ou de vins surchargés insérés régulièrement dans les séries analytiques et en suivant les cartes de contrôle afférentes.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Annexe A

Données statistiques obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoire

Les paramètres suivants ont été définis au cours d'un essai interlaboratoire. Cet essai a été conduit par l'Institut d'Œnologie de Bordeaux (France) sous la supervision de l'Office National Interprofessionnel des Vins (ONIVINS – France).

Année de l'essai interlaboratoire : 1994

Nombre de laboratoires : 7

Nombre d'échantillons : 9 en double aveugle

(Bulletin de l'O.I.V. novembre-décembre 1994, 765-766, p.916 à 962) valeurs recalculées conformément à l'ISO 5725-2:1994.

Types d'échantillons : vin blanc (BT), vin blanc (BT) surchargé = B1, vin blanc (BT) surchargé = B2, vin rouge n°1 (RT), vin rouge surchargé = R1, vin rouge (RT) surchargé = R2, vin rouge n°2 (CT), vin rouge (CT) surchargé = C1 et vin rouge (CT) surchargé = C2. Surcharges en mg/L.

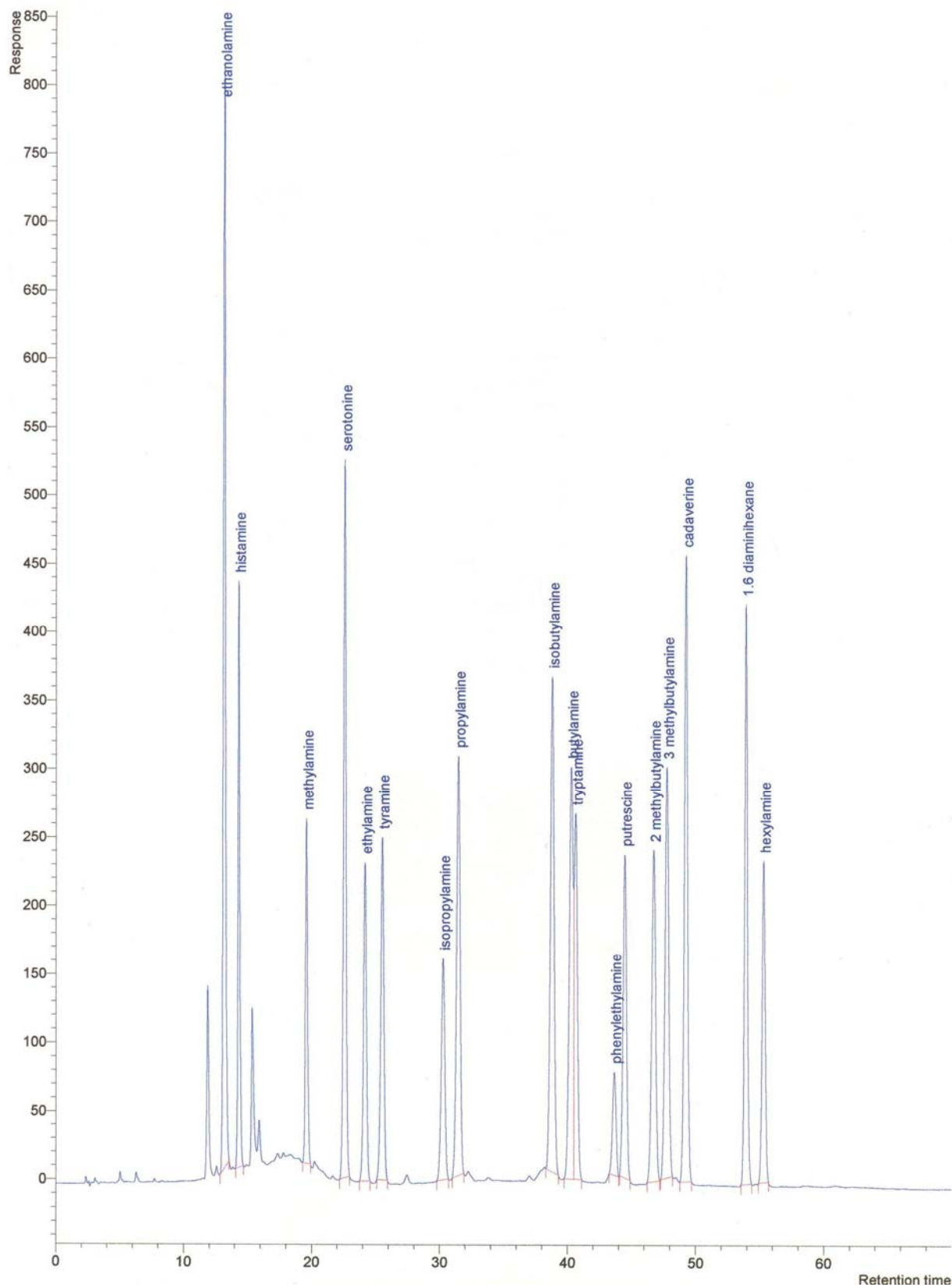
	HistN	MétN	EthN	TyrN	PhEtN	DiNbut	IsoamN	DiNpen
vin B1	vin BT + 0,5	vine BT + 0,12	vinBT + 0,13	vin BT + 0,36	vine BT + 0,15	vin BT + 0,5	vine BT + 0,28	vinBT + 0,25
vin B2	vin BT + 2	vin BT + 0,40	vin BT + 0,50	vin BT + 1,44	vin BT + 0,60	vin BT + 2	vin BT + 0,1,74	vin BT + 1,04
vin C1	vin CT + 2	vin CT + 0,1	vin CT + 0,18	vin CT + 0,72	vin CT + 0,15	vin CT + 2	vin CT + 0,29	vin CT + 0,26
vinC2	vin CT + 4	vin CT + 0,41	vin CT + 0,50	vin CT + 2,90	vin CT + 0,58	vin CT + 8	vin CT + 1,14	vin CT + 1,04
vin R1	vin RT + 2	vin RT + 0,14	vin RT + 0,13	vin RT + 1,45	vin RT + 0,19	vin RT + 3	vin RT + 0,0,57	vin RT + 0,51
vin R2	vin RT + 5	vin RT + 0,41	vin RT + 0,50	vin RT + 2,88	vin RT + 0,59	vin RT + 10	vin RT + 2,28	vin RT + 2,08

HistN : histamine, MetN : méthylamine, EthN : éthylamine, TyrN : tyramine,
PhEtN : phényléthylamine, DiNbut : diaminobutane, IsoamN : isoamylamine et
DiNpen : diaminopentane.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Annex B



Modèle de chromatogramme obtenu avec cette méthode

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

BIBLIOGRAPHIE

TRICARD C., CAZABEIL J.-M., SALAGOÏTI M.H. (1991) : dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, *Analisis*, 19, M53-M55.

PEREIRA MONTEIRO M.-J. et BERTRAND A. (1994) : validation d'une méthode de dosage – Application à l'analyse des amines biogènes du vin. *Bull. O.I.V.*, (765-766), 916-962.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 353/2009

MÉTHODE DE DÉTERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ DE L'EAU DANS LE VIN ET LE MOÛT

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

Considérant l'alinéa iv du paragraphe 2 de l'Article 2 de l'accord daté du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Considérant la résolution OENO 2/96 concernant la méthode de détermination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau dans le vin et l'étude inter-laboratoire collaborative,

Sur proposition de la Sous-commission « Méthodes d'analyse »,

DÉCIDE de remplacer l'actuelle méthode de type II de détermination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau dans le vin visée à l'Annexe A du Recueil de Méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts en y insérant la méthode suivante :

Intitulé	Type de la méthode
Méthode de détermination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau dans le vin et le moût	II

1. CHAMP D'APPLICATION

La méthode permet la détermination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau dans le vin et le moût après équilibrage avec du CO_2 , par spectrométrie de masse isotopique (SMRI).

2. NORMES DE RÉFÉRENCE

ISO 5725:1994 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure : méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.

V-SMOW : *Vienna-Standard Mean Ocean Water* ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = R_{\text{V-SMOW}} = 0,0020052$).

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

GISP *Greenland Ice Sheet Precipitation*
 SLAP *Standard Light Antarctic Precipitation*

3. DÉFINITIONS

$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Rapport isotopique entre l'oxygène 18 et l'oxygène 16 pour un échantillon donné
 $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}}$ Échelle relative pour l'expression du rapport isotopique entre l'oxygène 18 et l'oxygène 16 pour un échantillon donné. $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}}$ se calcule par l'équation suivante :

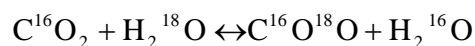
$$\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} = \left[\frac{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{sample}} - \left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{standard}}}{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{standard}}} \right] \times 1000 \text{ [‰]}$$

avec V-SMOW comme étalon et point de référence pour l'échelle relative δ .

BCR Bureau communautaire de référence
 AIEA Agence internationale de l'Énergie atomique (Vienne, Autriche)
 IRMM Institut des matériaux et mesures de référence
 SMRI Spectrométrie de masse isotopique
 m/z Rapport masse sur charge
 NIST *National Institute of Standards & Technology*
 MR matériau de référence

4. PRINCIPE

La technique décrite ci-après est fondée sur l'équilibrage isotopique de l'eau dans des échantillons de vin ou de moût avec un gaz-type CO_2 selon la réaction d'échange isotopique suivante :



Après équilibrage, le dioxyde de carbone dans la phase gazeuse est utilisé pour analyse par spectrométrie de masse isotopique (SMRI), où le rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ est déterminé sur le CO_2 résultant de l'équilibrage.

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

5. RÉACTIFS ET MATÉRIAUX

Les matériaux et consommables sont fonction de la méthode employée (voir la section 6). Les systèmes généralement utilisés sont fondés sur l'équilibrage de l'eau dans du vin ou du moût avec du CO₂.

Les matériaux de référence, étalons de travail et consommables suivants peuvent être utilisés :

5.1 Matériaux de référence

Nom	Éditeur/Auteur	δ ¹⁸ O versus V-SMOW
V-SMOW, MR 8535	AIEA / NIST	0 ‰
BCR-659	IRMM	- 7,18 ‰
GISP, MR 8536	AIEA / NIST	- 24,78 ‰
SLAP, MR 8537	AIEA / NIST	- 55,5 ‰

5.2 Étalons de travail

5.2.1 Dioxyde de carbone employé pour l'équilibrage et comme gaz de référence secondaire pour la mesure (CAS 00124-38-9).

5.2.2 Le dioxyde de carbone utilisé pour l'équilibrage (selon l'instrumentation, le gaz pourrait être identique à celui en 5.2.1 ou dans le cas d'un système de cylindres à flux continu, un mélange gazeux d'hélium- et de dioxyde carbone peut aussi être utilisé.

5.2.3 Étalons de travail avec des valeurs δ¹⁸O_{V-SMOW} calibrés par rapport à des matériaux de référence internationaux.

5.3 Consommables

Hélium pour analyse (CAS 07440-59-7).

6. APPAREILLAGE

6.1 Spectrométrie de masse isotopique (SMRI)

Le spectromètre de masse isotopique (SMRI) permet la détermination des teneurs relatives en ¹³C de gaz CO₂ en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰. La précision interne se définit ici comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO₂.

Le spectromètre de masse utilisé pour déterminer la composition isotopique du gaz CO₂ est généralement équipé d'un collecteur triple afin de mesurer simultanément les courants ioniques suivants :

- m/z = 44 (¹²C¹⁶O¹⁶O)
- m/z = 45 (¹³C¹⁶O¹⁶O et ¹²C¹⁷O¹⁶O)
- m/z = 46 (¹²C¹⁶O¹⁸O, ¹²C¹⁷O¹⁷O et ¹³C¹⁷O¹⁶O)

En mesurant les intensités correspondantes, le rapport isotopique ¹⁸O/¹⁶O est déterminé à partir du rapport des intensités de m/z = 46 et m/z = 44 après corrections pour les espèces isobariques (¹²C¹⁷O¹⁷O et ¹³C¹⁷O¹⁶O) dont les contributions peuvent être calculées à partir de l'intensité effective observée pour m/z = 45 et des abondances isotopiques habituelles de ¹³C et ¹⁷O dans la nature.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Le spectromètre de masse isotopique doit être équipé d'un des systèmes suivants :

- système à double introduction (double entrée) pour mesurer en alternance l'échantillon inconnu et l'étalon de référence.
- ou système à flux continu qui transfère quantitativement dans le spectromètre de masse le CO₂ depuis les fioles d'échantillon après équilibrage, mais aussi le CO₂, gaz de référence,

6.2 Equipement et matériel

Tout le matériel doit satisfaire aux exigences de la méthode ou de l'appareillage utilisé (spécifiées par le fabricant). Cependant, les matériels pourront être remplacés par des éléments aux performances analogues.

- 6.2.1 Fioles avec des septums adaptés au système employé.
- 6.2.2 Pipettes volumétriques avec des cônes adaptés.
- 6.2.3 Système thermiquement régulé pour effectuer l'équilibrage à température constante, généralement à ±1 °C.
- 6.2.4 Pompe à vide (si le système employé l'exige).
- 6.2.5 Passeur d'échantillons (si le système employé l'exige).
- 6.2.6 Seringues pour l'échantillonnage (si le système employé l'exige).
- 6.2.7 Colonne CG pour séparer le CO₂ d'autres gaz élémentaires (si le système employé l'exige).
- 6.2.8 Dispositif d'élimination d'eau (ex. : cryopiège, membranes perméables sélectives).

7. ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons de vin et de moût, ainsi que les matériaux de référence, sont utilisés pour l'analyse sans prétraitement. En cas d'une possible fermentation de l'échantillon, il faudrait ajouter de l'acide benzoïque (ou un autre antifermant) ou filtrer avec un filtre de diamètre de pore de 0,22 µm.

Les matériaux de référence utilisés pour le calibrage et la correction des dérives doivent, de préférence, être placés au début et à la fin de la séquence et être insérés à des intervalles de dix échantillons.

8. PROCÉDURE

Les descriptions ci-après renvoient aux procédures généralement appliquées pour la détermination des rapports isotopiques ¹⁸O/¹⁶O par équilibrage de l'eau avec un étalon de travail de CO₂ et mesure par SMRI. Ces procédures peuvent être adaptées en fonction des modifications apportées aux matériels et instruments par les fabricants ainsi différents appareils d'équilibre sont disponibles, exigeant différentes conditions de fonctionnement. Deux principales procédures techniques peuvent être utilisées pour introduire le CO₂ dans l'IRMS soit par un système de double orifice soit par l'utilisation du système en flux continu. La description de ces systèmes techniques ainsi que les conditions de l'opération correspondantes n'est pas possible.

Remarque : toutes les valeurs mentionnées pour les volumes, les températures, les pressions et les délais sont fournies à titre purement indicatif. Les valeurs exactes doivent être spécifiées sur

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

la base des caractéristiques techniques des fabricants et/ou déterminées de manière expérimentale.

8.1 Équilibrage manuel

Un volume défini de l'échantillon/étalon est transféré dans un flacon au moyen d'une pipette. Le flacon est ensuite solidement fixé au collecteur.

Chaque collecteur est refroidi à une température inférieure à - 80 °C de manière à congeler les échantillons. (un collecteur muni d'une tube capillaire ne nécessite pas cette étape de congélation) Par la suite, le vide est fait dans tout le système.

Une fois qu'un vide stable est établi, le CO₂ gazeux servant d'étalon de travail est introduit dans les différents flacons. Pour le processus d'équilibrage, chaque collecteur est placé dans un bain d'eau thermiquement régulé à 25 °C (± 1 °C) pendant 12 heures (jusqu'au lendemain). Il est crucial que la température du bain d'eau soit maintenue constante et homogène.

Une fois le processus d'équilibrage achevé, le CO₂ obtenu est transféré depuis les flacons vers le côté échantillon sous le système d'introduction double,. Les mesures sont prises en comparant plusieurs fois les rapports du CO₂ contenus côté échantillon et côté étalon (gaz étalon de référence : CO₂) du système d'introduction double. Cette approche est répétée jusqu'à ce que le dernier échantillon de la séquence soit mesuré.

8.2 Utilisation d'un appareil d'équilibrage automatique

Un volume défini de l'échantillon/étalon est transféré dans une fiole au moyen d'une pipette. Les fioles d'échantillon sont fixées au système d'équilibrage et refroidies à une température inférieure à - 80 °C de manière à congeler les échantillons. (un collecteur muni d'une tube capillaire ne nécessite pas cette étape de congélation) Par la suite, le vide est fait dans tout le système.

Une fois qu'un vide stable est établi, le CO₂ gazeux servant d'étalon de travail est introduit dans les fioles. L'équilibre est généralement atteint à une température de $22 \pm 0,5$ °C à l'issue d'un délai minimal de 5 heures, avec une agitation modérée (le cas échéant). Comme la durée de l'équilibrage est fonction de divers paramètres (ex. : la géométrie de la fiole, la température, l'agitation, etc.), la durée minimale d'équilibre doit être déterminée de manière expérimentale.

Une fois le processus d'équilibrage achevé, le CO₂ obtenu est transféré depuis les fioles vers le côté échantillon du système d'introduction double,. Les mesures sont prises en comparant plusieurs fois les rapports du CO₂ contenus côté échantillon et côté étalon (gaz étalon de référence : CO₂) du système d'introduction double. Cette approche est répétée jusqu'à ce que le dernier échantillon de la séquence soit mesuré.

8.3 Préparation manuelle et d'équilibrage automatique et analyse d'une système de double orifice couplé à un système à flux continu IRMS

Un volume défini de l'échantillon/étalon (200 ul par exemple) est transféré dans une fiole au moyen d'une pipette. Les fioles ouvertes sont placées dans une chambre fermée remplie de CO₂ utilisée pour l'équilibrage (5.2.2). Après plusieurs purges pour éliminer toute trace d'air, les fioles sont fermées et placées sur un plateau thermiquement régulé du passeur d'échantillons. L'équilibrage est atteint après au moins 8 heures à 40°C. Une fois le processus d'équilibrage terminé, le CO₂ obtenu est séché et transféré du côté échantillon du système de double orifice. Les déterminations sont effectuées à plusieurs reprises par la comparaison des pourcentages de

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

CO₂ contenus du côté échantillon et du côté étalon (le CO₂ référence du gaz étalon) du double orifice. Cette approche est répétée jusqu'à la détermination du dernier échantillon de la séquence.

8.3 Utilisation d'un appareil d'équilibrage automatique couplé à un système à flux continu

Un volume défini de l'échantillon/étalon est transféré dans une fiole au moyen d'une pipette. Les fioles d'échantillon sont placées sur un plateau thermiquement régulé.

À l'aide d'une seringue à gaz, les fioles sont rincées avec un mélange de He et de CO₂. Le CO₂ demeure dans l'espace de tête des fioles pour l'équilibrage.

L'équilibre est généralement atteint à une température de 30 ± 1 °C à l'issue d'un délai minimal de 18 heures.

Une fois le processus d'équilibrage achevé, le CO₂ obtenu est transféré par le système à flux continu vers la source ionique du spectromètre de masse. Du gaz de référence CO₂ est également introduit dans le SMRI par le système à flux continu. La mesure est prise en fonction du protocole spécifique du matériel employé.

9. CALCULS

Les intensités pour m/z = 44, 45, 46 sont consignées pour chaque échantillon et pour les matériaux de référence analysés dans un lot de mesures. Les rapports isotopiques ¹⁸O/¹⁶O sont ensuite calculés par l'ordinateur et le logiciel du SMRI suivant les principes énoncés au paragraphe 6.1. Dans la pratique, les rapports isotopiques ¹⁸O/¹⁶O sont mesurés par rapport à un étalon de travail préalablement calibré par rapport au V-SMOW. De légères variations peuvent se produire pendant la mesure en ligne du fait des modifications dues aux conditions instrumentales. Dans ce cas, le δ¹⁸O des échantillons doit être corrigé en fonction de la différence entre la valeur δ¹⁸O de l'étalon de travail et sa valeur assignée, préalablement calibrée par rapport au V-SMOW. Entre deux mesures de l'étalon de travail, la variation est la correction appliquée aux résultats de l'échantillon, qui sont supposées linéaires. En effet, l'étalon de travail doit être mesuré au début et à la fin de toutes les séries d'échantillons. De ce fait, une correction peut être calculée pour chaque échantillon au moyen d'une interpolation linéaire entre deux valeurs (la différence entre la valeur assignée de l'étalon de travail et les mesures des valeurs obtenues).

Les résultats finaux sont présentés comme des valeurs relatives δ¹⁸O_{V-SMOW} exprimées en ‰. Les valeurs δ¹⁸O_{V-SMOW} se calculent par l'équation suivante :

$$\delta^{18}O_{V-SMOW} = \left[\frac{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O} \right)_{sample} - \left(\frac{^{18}O}{^{16}O} \right)_{V-SMOW}}{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O} \right)_{V-SMOW}} \right] \times 1000 \text{ [‰]}$$

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

La valeur $\delta^{18}\text{O}$ normalisée versus l'échelle V-SMOW/SLAP se calcule par l'équation suivante :

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW/SLAP}} = \left[\frac{\delta^{18}\text{O}_{\text{sample}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}}}{\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{SLAP}}} \right] \times 55.5 \text{ [‰]}$$

La valeur $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}}$ admise pour SLAP est de -55,5 ‰ (voir aussi 5.2).

10. PRÉCISION

La répétabilité (r) est égale à 0,24 ‰.

La reproductibilité (R) est égale à 0,50 ‰.

Résumé des résultats statistiques

	Moy générale (‰)	Ecart type de répétabilité (‰) S_r	Repetabilité (‰) r	Ecart type de reproductibilit é (‰) S_R	Reproductibilité (‰) R
Eau					
Echantillon 1	-8,20	0,068	0,19	0,171	0,48
Echantillon 2	-8,22	0,096	0,27	0,136	0,38
Vin N° 1					
Echantillon 5	6,87	0,098	0,27	0,220	0,62
Echantillon 8	6,02	0,074	0,21	0,167	0,47
Echantillon 9	5,19	0,094	0,26	0,194	0,54
Echantillon 4	3,59	0,106	0,30	0,205	0,57
Vin N° 2					
Echantillon 3	-1,54	0,065	0,18	0,165	0,46
Echantillon 6	-1,79	0,078	0,22	0,141	0,40
Echantillon 7	-2,04	0,089	0,25	0,173	0,49
Echantillon 10	-2,61	0,103	0,29	0,200	0,56

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

11. ÉTUDES INTERLABORATOIRES

Bulletin de l'O.I.V. janvier-février 1997, 791-792, pp.53 à 65.

12. BIBLIOGRAPHIE

[1] Allison, C.E., Francey, R.J. et Meijer., H.A., « Recommendations for the Reporting of Stable Isotopes Measurements of carbon and oxygen », Comptes rendus d'une réunion de consultants tenue à Vienne, 1-3 décembre 1993, IAEA-TECDOC-825, 1995, pp. 155-162, Vienne, Autriche.

[2] Baertschi, P., « Absolute ^{18}O Content of Standard Mean Ocean Water », Earth and Planetary Science Letters, 31, 1976, pp. 341-344.

[3] Breas, O., Reniero, F. et Serrini, G., « Isotope Ratio Mass Spectrometry: Analysis of wines from different European Countries », Rap. comm. Mass Spectrom., 8, 1994, pp. 967-987.

[4] Craig, H., « Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide », Geochim. Cosmochim. Acta, 12, 1957, pp. 133-149.

[5] Craig, H., « Isotopic Variations in Meteoric Waters », Science, 133, 1961, pp. 1702-1703.

[6] Craig, H., « Standard for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters », Science, 133, 1961, pp. 1833-1834.

[7] Coplen, T., « Normalization of oxygen and hydrogen data », Chemical Geology (Isotope Geoscience Section), 72, 1961, 1988, pp. 293-297.

[8] Coplen, T. et Hopple, J., « Audit of V-SMOW distributed by the US National Institute of Standards and Technology », Comptes rendus d'une réunion de consultants tenue à Vienne, 1-3 décembre 1993, Vienne, Autriche, AIEA, IAEA-TECDOC-825, 1995, pp. 35-38.

[9] Dunbar, J., « Detection of added water and sugar in New Zealand commercial wines », Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Corp. Edts., 1982, pp. 1495-501.

[10] Epstein, S. et Mayeda, T. »Variations of the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratio in natural waters », Geochim. Cosmochim. Acta, 4, 1953, pp. 213.

[11] Förstel, H., « Projet de description d'une méthode : variation naturelle du rapport des isotopes ^{16}O et ^{18}O dans l'eau comme méthode d'analyse physique du vin en vue du contrôle de l'origine et de l'addition d'eau », OIV, FV n° 919, 1992, pp. 1955/220792.

[12] Gonfiantini, R., « Standards for stable isotope measurements in natural compounds », Nature, 271, 1978, pp. 534-536.

[13] Gonfiantini, R., « Report on an advisory group meeting on stable isotope reference samples for geochemical and hydrochemical investigations », Vienne, Autriche, AIEA, 1987.

[14] Gonfiantini, R., Stichler, W. et Rozanski, K., « Standards and Intercomparison Materials distributed by the IAEA for Stable Isotopes Measurements », Comptes rendus d'une réunion de consultants tenue à Vienne, 1-3 décembre 1993, Vienne, Autriche, AIEA, IAEA-TECDOC-825, 1995, pp. 13-29.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

- [15] « Guidelines for Collaborative Study Procedures », J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72, 1989, pp. 694-704.
- [16] Martin, G.J., Zhang, B.L., Day, M. et Lees, M., « Authentification des vins et des produits de la vigne par utilisation conjointe des analyses élémentaire et isotopique », OIV, F.V., n° 917, 1993, pp. 1953/220792.
- [17] Martin, G.J., Förstel, H. et Moussa, I., « La recherche du mouillage des vins par analyse isotopique 2H et 18O », OIV, FV n° 1006, 1995, pp. 2268/240595.
- [18] Martin, G.J., « Recherche du mouillage des vins par la mesure de la teneur en 18O de l'eau des vins », OIV, FV n° 1018, 1996, pp. 2325/300196.
- [19] Martin, G.J. et Lees, M., « Détection de l'enrichissement des vins par concentration des moûts au moyen de l'analyse isotopique 2H et 18O de l'eau des vins », OIV, FV n° 1019, 1997, pp. 2326/300196.
- [20] Moussa, I., « Recherche du mouillage dans les vins par spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI) », OIV, FV n° 915, 1992, pp. 1937/130592.
- [21] Werner, R.A. et Brand, W., « Reference strategies and techniques in stable isotope ratio analysis », Rap. Comm. Mass Spectrom., 15, 2001, pp. 501-519.
- [22] Zhang, B.L., Fourel, F., Naulet, N. et Martin, G.J., « Influence de l'expérimentation et du traitement de l'échantillon sur la précision et la justesse des mesures des rapports isotopiques (D/H) et (18O/16O) », OIV, F.V. n° 918, 1992, pp. 1954/220792.
- [23] Breas, O., Schultheis G., Reniero F., and GuillouC. Method for 18O/16O isotope ratio determination of water in wine and must OIV FV 1261

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 387/2009

COMPLEMENT A LA METHODE DE DETERMINATION DE L'EXTRAIT SEC

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin,

Sur proposition de la Sous-Commission des méthodes d'analyse,
Considérant la méthode « Extrait sec total » adoptée par l'OIV et figurant dans le « Recueil des méthodes d'analyse des vins et des moûts » (MA-F-AS2-03-EXTSEC).

Vu le premier paragraphe –Définitions- de la méthode indiquée en objet, l'extrait non réducteur est défini comme extrait sec total déduit des sucres totaux, à savoir: Extrait non réducteur = Extrait sec total – sucres totaux

Considérant qu'aucune indication n'est faite sur la manière dont sont exprimés les sucres totaux.

Considérant que dans certains pays, les normes prévoient une limite pour l'extrait non réducteur

Considérant que le manque d'indications sur la façon de calculer les sucres totaux peut représenter un problème si le vin ou le produit à base de vin présente, à part les propres sucres, un ajout de saccharose comme c'est le cas des vins aromatisés.

DÉCIDE de compléter la méthode « Extrait sec total » figurant dans le « Recueil des méthodes d'analyse des vins et des moûts » (MA-F-AS2-03-EXTSEC). par la remarque suivante :

Remarque:

Calculer l'extrait sec total en prenant séparément en compte les quantités de glucose et fructose (sucres réducteurs) et la quantité de saccharose, à savoir:

Extrait non réducteur = Extrait sec total – sucres réducteurs (glucose + fructose) – saccharose

Si la méthode d'analyse prévoit une inversion des sucres, utiliser la formule suivante pour le calcul:

Extrait non réducteur = Extrait sec total – Sucres réducteurs (glucose + fructose) - [(Sucres après inversion – Sucres avant inversion) x 0,95]

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 374/2009

RECHERCHE ET DOSAGE DES POLYCHLOROPHENOLS ET DES POLYCHLOROANISOLES, DANS LES VINS, LES BOUCHONS, LES BOIS ET LES BENTONITES UTILISEES COMME PIEGES D'ATMOSPHERE – REVISION DE LA RESOLUTION OENO 8/2006

L'ASSEMBLEE GENERALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin

CONSIDERANT la résolution oeno 8/2006 relatif à la recherche et au dosage des polychlorophénols et des polychloroanisoles, dans les vins, les bouchons, les bois et les pièges d'atmosphère,

CONSIDERANT les travaux de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et la nécessité de réviser ladite résolution

DECIDE, sur proposition de la Commission Œnologie de modifier la méthode d'analyse AS315-13-PCAPCP figurant actuellement dans le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV par la méthode de type IV suivante:

Titre	Type de Méthode
RECHERCHE ET DOSAGE DES POLYCHLOROPHENOLS ET DES POLYCHLOROANISOLES, DANS LES VINS, LES BOUCHONS, LES BOIS ET LES BENTONITES UTILISEES COMME PIEGES D'ATMOSPHERE	IV

1. DOMAINE D'APPLICATION

Tous les vins, les bouchons en liège, bentonites (pièges d'atmosphère) et bois.

2. PRINCIPE

Dosage du 2,4,6-trichloroanisole, du 2,4,6-trichlorophénol, du 2,3,4,6-tétrachloroanisole, du 2,3,4,6-tétrachlorophénol, du pentachloroanisole et du pentachlorophénol en chromatographie en phase gazeuse par injection d'un extrait à l'hexane du vin et à l'éther/hexane des échantillons solides à analyser et étalonnage interne.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

3. REACTIFS

Note préalable : tous les réactifs et solvants doivent être exempts des composés à doser listés en 2 au seuil de détection.

3.1 Hexane de pureté ≥ 99 %

3.2 Ether éthylique de pureté ≥ 99 %

3.3 Mélange éther/hexane (50/50 ; v/v)

3.4 Étalon interne : 2,5-Dibromophénol, de pureté ≥ 99 %

3.5 Ethanol absolu

3.6 Eau désionisée pure, exempte de TCA, type II selon la Norme ISO EN 3696.

3.7 Solution hydroalcoolique à 50 % vol. placer 100 ml d'éthanol absolu (3.<5) dans une fiole jaugée de 200 ml (4.9.9) et compléter à 200 ml avec de l'eau désionisée (3.6), homogénéiser.

3.8 Etalon interne :

3.8.1 Solution mère à 200 mg/L. Placer 20 mg de étalon interne (3.4) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8) compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.8.2 Solution d'étalon interne (2 mg/L). Placer 1 ml de la solution mère d'étalon interne (3.8.1) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.8.3 Solution d'étalon interne (20 μ g/L). Placer 1 ml de la solution mère d'étalon interne (3.8.2) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.9 Produits purs

3.9.1 2,4,6-trichloroanisole : ≥ 99 %, cas : 87-40-1

3.9.2 2,4,6-trichlorophénol : ≥ 99 %, cas : 88-06-2

3.9.3 2,3,5,6-tétrachloroanisole : ≥ 99 %, cas : 6936-40-9 (remarque : le produit recherché dans les échantillons est le 2,3,4,6-tétrachloroanisole mais il n'existe pas dans le commerce)

3.9.4 2,3,4,6-tétrachlorophénol : ≥ 99 %, cas : 58-90-2

3.9.5 pentachloroanisole : ≥ 99 %, cas : 1825-21-1

3.9.6 pentachlorophénol : ≥ 99 %, cas : 87-86-5

3.10 Réactifs pour la derivatisation - Pyridine:anhydride acétique (1:0,4) vol.

3.10.1 Pyridine: ≥ 99 %

3.10.2 Anhydride acétique: ≥ 98 %

3.11 Solution mère de calibrage à 200 mg/l

Dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), placer 20 mg environ des produits purs (3.9.1 à 3.9.6) de poids exactement connu (4.7), compléter avec de l'éthanol absolu (3.5). Homogénéiser.

3.12 Solution intermédiaire de calibrage à 200 μ g/l

Dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8) remplie d'éthanol absolu (3.5), ajouter 100 μ l de la solution mère de calibrage à 200 mg/l (3.11) à l'aide de la micro-seringue de 100 μ l (4.9.1) et homogénéiser.

3.13 Solution fille de calibrage à 4 μ g/l

Dans une fiole jaugée de 50 ml (4.9.7) contenant de solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) ajouter 1 ml de la solution intermédiaire de calibrage à 200 μ g/l (3.12) à l'aide d'une pipette de 1 ml (4.9.6). Compléter à 50 ml avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

3.14 Solutions de calibrage. Il est possible de préparer diverses solutions de calibrage à diverses concentrations en rajoutant, à l'aide de la micro-seringue de 100 µl (4.9.1), par exemple 50 µl de la solution fille de calibrage à 4 µg/l (3.13) dans 50 ml de solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) pour obtenir un enrichissement de celui ci de 4 ng/l en substances à doser.

Le même raisonnement peut permettre de préparer des solutions de calibrage de diverses concentrations soit dans des solutions hydroalcooliques ou du vin ou encore d'enrichir un milieu d'extraction avec une quantité parfaitement connue de produits purs.

3.15 Bentonite du commerce.

4. MATERIEL

4.1 Chromatographe en phase gazeuse avec injecteur split-splitless couplé à un détecteur à capture d'électrons. (Il est également possible d'utiliser un spectromètre de masse)

4.2 Colonne capillaire de phase stationnaire apolaire, type phénylmethylpolysiloxane (0,32 mm x 50 m, épaisseur de film 0,12 µm), ou équivalent.

4.3 Conditions chromatographiques, à titre d'exemple:

4.3.1 Injection en mode "split-splitless" (temps de fermeture des vannes 30 secondes)

4.3.2 Débit gaz vecteur : 30 ml/min dont 1 ml dans la colonne – Hydrogène, de pureté chromatographique (≥ 99,9990%). Il est également possible d'utiliser de l'hélium ou de l'azote.

4.3.3 Débit gaz auxiliaire : 60 ml/min – Azote, de pureté chromatographique (≥ 99,9990%). Il est également possible d'utiliser argon-méthane.

4.3.4 Gradient de température du four, donné à titre d'exemple:

- de 40 °C à 160 °C à raison de 2 °C/min
- de 160 °C à 200 °C à raison de 5 °C/min
- palier à 220 °C pendant 10 min

4.3.5 Température injecteur : 250 °C

4.3.6 Température détecteur : 250 °C

4.4 Acquisition et intégration : l'acquisition se fait sur un ordinateur. Les pics des différents composés identifiés par comparaison avec la référence, sont ensuite intégrés.

4.5 Agitateur.

4.6 Vortex avec adaptation pour flacon de 30 ml (4.9.3)

4.7 Balance de précision à 0,1 mg

4.8 Râpe de ménage pour rémoulade manuelle ou électrique

4.9 Matériel de laboratoire :

4.9.1 Micro Seringue de 100 µl

4.9.2 Micro Seringue de 10 µl

4.9.3 Flacon de 30 ml fermant avec un bouchon à vis et opercule à face téflonée

4.9.4 Pipette de 10 ml graduée au 1/10 de ml

4.9.5 Pipette de 5 ml graduée au 1/10 de ml

4.9.6 Pipette de précision de 1 ml

4.9.7 Fiole jaugée de 50 ml

4.9.8 Fiole jaugée de 100 ml

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

- 4.9.9 Fiole jaugée de 200 ml
- 4.9.10 Ampoule à décanter de 100 ml
- 4.9.11 Pipettes Pasteur et poire propipette adaptée
- 4.9.12 Feuille d'aluminium de ménage en rouleau.
- 4.9.13 Centrifugeuse

5. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

- 5.1 Le bouchon est râpé (4.8) ou coupé en morceaux (dimension < 3 mm)
- 5.2 Le bois est débité avec une tenaille pour obtenir des morceaux (dimension < 3 mm)
- 5.3 La bentonite (3.15) (30 g par exemple) est étalée sur une feuille d'aluminium (4.9.12) d'environ 30 cm x 20 cm et exposée dans l'atmosphère à analyser pendant, au minimum, 5 jours.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Processus d'extraction pour les échantillons solides :

- 6.1.1 Bouchon : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 1 g environ de bouchon râpé (5.1) de poids exactement connu (4.7)
- 6.1.2 Bois : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 2 g environ de morceaux de bois (5.2) de poids exactement connu (4.7)
- 6.1.3 Bentonite contrôle : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 5 g environ de bentonite (3.15) de poids exactement connu (4.7)
- 6.1.4 Bentonite échantillon : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 5 g environ de bentonite (5.3) de poids exactement connu (4.7)
- 6.1.5 Ajouter 10 ml (4.9.4) de mélange éther/hexane (3.3)
- 6.1.7 Ajouter à la micro-seringue (4.9.1) 50 µl de la solution d'étalon interne (3.8.3)
- 6.1.8 Agiter au vortex (4.6) pendant 3 min
- 6.1.9 Récupérer la phase liquide d'éther/hexane dans un flacon de 30 ml (4.9.3)
- 6.1.10 Recommencer l'opération d'extraction sur l'échantillon, avec 2 fois 5 ml de mélange éther/hexane (3.3)
- 6.1.11 Extrait final : mélanger les 3 phases d'éther/hexane.

6.2 Extraction du vin et des solutions de calibrage.

- 6.2.1 Prélever 50 ml de vin ou de solution de calibrage (3.14) à l'aide de la fiole jaugée (4.9.7)
- 6.2.2 Les placer dans la fiole jaugée de 100 ml (4.9.8)
- 6.2.3 Ajouter à la microseringue (4.9.1) 50 µl d'étalon interne (3.8.3)
- 6.2.4 Ajouter 4 ml (4.9.5) d'hexane (3.1)
- 6.2.5 Effectuer l'extraction à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 5 min.
- 6.2.6 Décanter en ampoule (4.9.10)
- 6.2.7 Récupérer la phase organique avec l'émulsion dans un flacon de 30 ml (4.9.3) et la phase aqueuse dans la fiole jaugée de 100 ml (4.9.8)
- 6.2.8 Recommencer l'extraction du vin ou de solution de calibrage par 2 ml d'hexane (3.1)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

- 6.2.9 Effectuer l'extraction à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 5 min.
- 6.2.10 Décanter en ampoule (4.9.10)
- 6.2.11 Récupérer la phase organique avec l'émulsion dans le même flacon de 30 ml mentionné à 6.2.7 (contenant la phase organique obtenue au terme de la première extraction).
- 6.2.12 Casser l'émulsion de la phase organique par centrifugation (4.9.13), en éliminant la phase aqueuse inférieure à l'aide d'une pipette Pasteur (4.9.11) munie d'une poire propipette.
- 6.2.13 Extrait final du vin et des solutions de calibrage : il s'agit de l'extrait organique résiduel.

6.3 Analyse

- 6.3.1 Ajouter au extrait final (6.1.11 ou 6.2.13) 100 µl (4.9.1) de mélange réactif piridine:anhydride acétique (3.10) pour la dérivation.
- 6.3.2 Agiter à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 10 min.
- 6.3.3 Injecter 2 µl de l'extrait final dérivatisé (6.3.2) dans le chromatographe.

7. CALCUL :

$$\text{concentration du produit} = \frac{\text{Aire du pic du produit}}{\text{Aire du pic de l'étalon interne}} \times \text{Coefficient de réponse}$$

Coefficient de réponse = concentration dans la solution de calibrage (3.14) *(Aire du pic de l'étalon interne/ Aire du pic du produit pur dans la solution de calibrage).

Vérification de l'étalonnage, en assurant des coefficients de réponse +/- 10 %.

8. RESULTATS

Les résultats sont exprimés en ng/l pour le vin et en ng/g pour les bouchons en liège, les bentonites et les bois.

9. CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

9.1 Taux de recouvrement,

Le taux de recouvrement calculé par rapport à des quantités rajoutées dans des bois, de polychloroanisoles et de polychlorophénols de 115 ng/g est de :

- 2,4,6-trichloroanisole : 96 %
- 2,4,6-trichlorophénol : 96 %
- 2,3,4,6-tétrachloroanisole : 96 %
- 2,3,4,6-tétrachlorophénol : 97 %
- pentachloroanisole : 96 %
- pentachlorophénol : 97 %

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

9.2 Répétabilité des mesures,

Calculées pour chaque produit, les valeurs de répétabilité sont les suivantes :

Dans un bouchon ng/g	Moyenne	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	1,2	0,1	0,3
2,4,6-trichlorophénol	26	3,3	9,2
2,3,4,6-tétrachloroanisole	1,8	0,4	1,2
2,3,4,6-tétrachlorophénol	2,6	0,3	0,9
pentachloroanisole	23,3	2,9	8,1
pentachlorophénol	7,4	1,9	5,4

Dans un bois à 23 ng/g	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	1,9	5,3
2,4,6-trichlorophénol	1,9	5,3
2,3,4,6-tétrachloroanisole	2,6	7,4
2,3,4,6-tétrachlorophénol	3,3	9,3
pentachloroanisole	2,7	7,5
pentachlorophénol	3,6	10,1

Dans un vin à 10 ng/l	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	0,4	1,1
2,4,6-trichlorophénol	2,1	5,9
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,6	1,7
2,3,4,6-tétrachlorophénol	4	11,2
pentachloroanisole	1,2	3,4
pentachlorophénol	6,5	18,2

Dans une bentonite à 15 ng/g	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	0,9	2,5
2,4,6-trichlorophénol	4	11,2
2,3,4,6-tétrachloroanisole	1,2	3,4
2,3,4,6-tétrachlorophénol	5,2	14,6
pentachloroanisole	4,3	12,0
pentachlorophénol	12,1	33,9

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

9.3 Limites de détection (L.D) et de quantification (L.Q) calculées selon la méthode OIV :

9.3.1 Bois

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,7	2,4
2,4,6-trichlorophénol	0,6	2,0
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,6	2,0
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1,1	3,7
pentachloroanisole	0,4	1,4
pentachlorophénol	0,9	3,1

9.3.2 Bentonite

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,5	1
2,4,6-trichlorophénol	1	3
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,5	1
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1	3
pentachloroanisole	0,5	1
pentachlorophénol	Non det.	Non det.

9.3.3 Bouchon

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,5	1,5
2,4,6-trichlorophénol	1	2
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,5	1,5
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1	2
pentachloroanisole	0,5	1,5
pentachlorophénol	1	2

9.3.4 Vin

	L.D en ng/l	L.Q en ng/l
2,4,6-trichloroanisole	0,3	1
2,4,6-trichlorophénol	1	3
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,3	1
2,3,4,6-tétrachlorophénol	0,3	1
pentachloroanisole	0,5	3
pentachlorophénol	1	3

®² Air liquide

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 379/2009

ACTUALISATION DU RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE DE L'OIV - Partie 1

L'ASSEMBLEE GENERALE

VU l'article 2 paragraphe 2b iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

VU les actions du plan stratégique de l'OIV 2009-2012 en particulier celle qui vise à réorganiser les publications relatives aux méthodes d'analyse vitivinicoles

CONSIDERANT les travaux de la sous-commission des méthodes d'analyse

VU l'édition de 1994 du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons

COMPTE TENU de l'évolution des méthodes et de la disponibilité des paramètres de validation inter-laboratoire depuis 1994, qui sont déjà reconnus par des instances internationales, il convient dans la mesure du possible, de retenir et de décrire comme méthodes d'analyse de Type II, les méthodes suivantes ;

CONSIDERANT que certaines méthodes d'analyse ne sont plus utilisées et devraient être éliminées du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons,

ENTENDU qu'aux fins de la présente résolution, on définit 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'écart de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée {ISO 3534-1}.

DECIDE de réviser l'édition de 1994 du « Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons » en retenant et décrivant comme méthodes d'analyse de Type II, les méthodes suivantes ; et de modifier le titre du recueil comme tel « Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicoles »

DECIDE que les méthodes figurant dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons seront, si nécessaire, modifiées en conséquence.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

DÉTERMINATION DU TITRE ALCOOMÉTRIQUE VOLUMIQUE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITI-VINICOLE: Remarques générales

Introduction

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

Annexe I - Préparation du distillat

Annexe II - Mesure de la masse volumique du distillat par trois méthodes A, B, et C

1. Champ d'application

La méthode convient pour la détermination du titre alcoométrique volumique réel des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

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 °C.

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

3.2 Masse volumique

La masse volumique est le quotient de la masse d'un certain volume de boisson spiritueuse à 20 °C par ce volume dans le vide. Elle s'exprime en kilogrammes par mètre cube et son symbole est $\rho_{20\text{ °C}}$ 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 °C à la masse volumique de l'eau à la même température. Elle est désignée par le symbole $d_{20\text{ °C}/20\text{ °C}}$ ou $d_{20/20}$, ou simplement d lorsque aucune confusion n'est possible. La caractéristique mesurée doit être précisée dans le certificat d'analyse exclusivement à l'aide des symboles ci-dessus.

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

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

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 °C en fonction de la masse volumique à 20 °C des mélanges hydroalcooliques sont celles qui figurent dans la table internationale adoptée par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa recommandation n° 22.

Remarque 3: dans le cas des liqueurs et crèmes pour lesquelles il est très difficile de mesurer un volume exact, l'échantillon doit être pesé et on calcule d'abord le titre alcoométrique massique.

Formule de conversion:

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

où TAM = titre alcoométrique massique,

$$\rho_{20} (\text{alcool}) = 789,24 \text{ kg/m}^3$$

4. Principe

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

5. Bibliographie

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, *J.O.C.E. du 29 décembre 2000, L333/20*

P. Brereton, S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski, C. Guillou, Analytical methods for the determination of spirit drinks, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, No. 1, 19-25, 2003

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe I: DÉTERMINATION DU TITRE ALCOOMÉTRIQUE VOLUMIQUE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITI-VINICOLE : 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 d'origine vitivinicole.

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 °C.

Bain-marie pouvant être maintenu à 20 °C ($\pm 0,2$ °C).

4.2 Fioles jaugées (100 et 200 ml) de classe A, vérifiées à $\pm 0,1$ 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 pyrogénéation des matières extractives.

4.3.2 A titre d'exemple, un appareil de distillation approprié comprendrait:

- 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;

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

- 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

6.1 Contrôle de l'appareil de distillation

L'appareil utilisé doit répondre aux exigences ci-après :

La distillation de 200 ml d'une solution hydroalcoolique 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 °C).

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 °C 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 $\pm 0,5$ °C 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 (annexe 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.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

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°C 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 $\pm 0,5^\circ\text{C}$ 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 (annexe II).

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Annexe IIA: DETERMINATION DU TITRE ALCOOMETRIQUE VOLUMIQUE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITI-VINICOLE PAR PYCNOMETRIE

**Méthode de type II
Année : 2009**

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 °C. 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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

L'étalonnage du pycnomètre comporte la détermination des caractéristiques suivantes:
tare à vide,
volume à 20 °C,
masse en eau à 20 °C.

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 °C (P1),
la masse du flacon tare (T0).

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

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 °C 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.
 $m = 0,0012 \times (P1 - P)$

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

- Volume du pycnomètre à 20 °C
 $V_{20\text{ °C}} = [P1 - (P - m)] \times F_t$
où F_t est le facteur relevé pour la température t °C dans la table I ci-dessous.
 $V_{20\text{ °C}}$ doit être connu à 0,001 ml près.
- Masse de l'eau contenue dans le pycnomètre à 20 °C
 $M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$
où 0,998203 est la masse volumique de l'eau à 20 °C.

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. (p)

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 °C 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. (p')

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

A.4.1.2.3 Calcul

- Tare du pycnomètre vide = $p + m$
où m est la masse de l'air contenu dans le pycnomètre.
 $m = 0,0012 \times (p - p')$
- Volume du pycnomètre à 20 °C
 $V_{20\text{ °C}} = (p + m - p') \times F_t$
où F_t est le facteur relevé pour la température t °C dans la table I ci-dessous.
 $V_{20\text{ °C}}$ doit être connu à 0,001 ml près.
- Masse de l'eau contenue dans le pycnomètre à 20 °C
 $M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$
où 0,998203 est la masse volumique de l'eau à 20 °C.

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 annexe I), soit P2 sa masse à t °C.

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 °C
 $= P2 - (P - m + dT)$
- Masse volumique à t °C en g/ml
- $\rho_{t\text{ °C}} = [P2 - (P - m + dT)] / V_{20\text{ °C}}$
Exprimer la masse volumique à t °C en kilogrammes par m^3 en multipliant $\rho_{t\text{ °C}}$ par 1000, soit ρ_t cette valeur.
- Corriger ρ_t à l'aide de la table des masses volumiques ρ_T des mélanges hydroalcooliques dans le Recueil des méthodes d'analyse des vins et des moûts de l'OIV.
Dans cette table, chercher sur la ligne horizontale correspondant à la température entière T immédiatement inférieure à t °C 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 ρ' 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 °C ($\pm 0,2$ °C) 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.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

La table indiquant la valeur du titre alcoométrique volumique (% vol.) à 20 °C en fonction de la masse volumique à 20 °C des mélanges hydroalcooliques est la table internationale adoptée par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa recommandation n° 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 Annexe I), soit p'' sa masse à t °C.

A.4.2.2.2 Calcul

- Masse du liquide contenu dans le pycnomètre à t °C
 $= p + m - p''$
- Masse volumique à t °C en g/ml
 $\rho_{t\text{ °C}} = (p + m - p'')/V_{20\text{ °C}}$
- Exprimer la masse volumique à t °C en kilogrammes par m^3 et procéder à la correction de température afin de calculer le titre alcoométrique à 20 °C, en suivant les indications fournies pour l'utilisation de la balance monoplateau.

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, sur des boissons spiritueuses diverses, réalisée conformément aux procédures établies au niveau international.

Année de l'essai interlaboratoire	1997
Nombre de laboratoires	20
Nombre d'échantillons	6

Échantillons	A	B	C
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	19	20	17
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	1	-	2
Nombre de résultats acceptés	38	40	34
Valeur moyenne (\bar{x}) % vol.	23,77	40,04	40,29
	26,51*		
Écart-type de répétabilité (s_r) % vol.	0,106	0,176	0,072
Écart-type relatif de répétabilité (RSD _r) (%)	0,42	0,44	0,18
Limite de répétabilité (r) % vol.	0,30	0,49	0,20
Écart-type de reproductibilité (s_R) % vol.	0,131	0,236	0,154
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD _R) (%)	0,52	0,59	0,38
Limite de reproductibilité (R) % vol.	0,37	0,66	0,43

Types d'échantillons

A Liqueur de fruit; doubles avec une teneur différente*

B Brandy; doubles en aveugle

C Whisky; doubles en aveugle

*Exemplaire certifié conforme
 Zagreb, le 3 juillet 2009
 Le Directeur Général de l'OIV
 Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Échantillons	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	19	19	17
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	1	1	3
Nombre de résultats acceptés	38	38	34
Valeur moyenne (\bar{x}) % vol.	39,20	42,24	57,03
	42,93*	45,73*	63,03*
Écart-type de répétabilité (s_r) % vol.	0,103	0,171	0,190
Écart-type relatif de répétabilité (RSD _r) (%)	0,25	0,39	0,32
Limite de répétabilité (r) % vol.	0,29	0,48	0,53
Écart-type de reproductibilité (s_R) % vol.	0,233	0,238	0,322
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD _R) (%)	0,57	0,54	0,53
Limite de reproductibilité (R) % vol.	0,65	0,67	0,90

Types d'échantillons

D Grappa; doubles avec une teneur différente*

E Aquavit; doubles avec une teneur différente*

F Rhum; doubles avec une teneur différente*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Tableau 1

F facteurs par lesquels la masse d'eau contenue dans le pycnomètre en Pyrex à T°C doit être multiplié afin de calculer le volume du pycnomètre à 20°C

t°C	F	t°C	F	t°C	F	t°C	F	t°C	F	t°C	F	t°C	F
10,0	1,000398	13,0	1,000691	16,0	1,001097	19,0	1,001608	22,0	1,002215	25,0	1,002916	28,0	1,003704
,1	1,000406	,1	1,000703	,1	1,001113	,1	1,001627	,1	1,002238	,1	1,002941	,1	1,003731
,2	1,000414	,2	1,000714	,2	1,001128	,2	1,001646	,2	1,002260	,2	1,002966	,2	1,003759
,3	1,000422	,3	1,000726	,3	1,001144	,3	1,001665	,3	1,002282	,3	1,002990	,3	1,003787
,4	1,000430	,4	1,000738	,4	1,001159	,4	1,001684	,4	1,002304	,4	1,003015	,4	1,003815
10,5	1,000439	13,5	1,000752	16,5	1,001175	19,5	1,001703	22,5	1,002326	25,5	1,003041	28,5	1,003843
,6	1,000447	,6	1,000764	,6	1,001191	,6	1,001722	,6	1,002349	,6	1,003066	,6	1,003871
,7	1,000456	,7	1,000777	,7	1,001207	,7	1,001741	,7	1,002372	,7	1,003092	,7	1,003899
,8	1,000465	,8	1,000789	,8	1,001223	,8	1,001761	,8	1,002394	,8	1,003117	,8	1,003928
,9	1,000474	,9	1,000803	,9	1,001239	,9	1,001780	,9	1,002417	,9	1,003143	,9	1,003956
11,0	1,000483	14,0	1,000816	17,0	1,001257	20,0	1,001800	23,0	1,002439	26,0	1,003168	29,0	1,003984
,1	1,000492	,1	1,000829	,1	1,001273	,1	1,001819	,1	1,002462	,1	1,003194	,1	1,004013
,2	1,000501	,2	1,000842	,2	1,001290	,2	1,001839	,2	1,002485	,2	1,003222	,2	1,004042
,3	1,000511	,3	1,000855	,3	1,001306	,3	1,001859	,3	1,002508	,3	1,003247	,3	1,004071
,4	1,000520	,4	1,000868	,4	1,001323	,4	1,001880	,4	1,002531	,4	1,003273	,4	1,004099
11,5	1,000530	14,5	1,000882	17,5	1,001340	20,5	1,001900	23,5	1,002555	26,5	1,003299	29,5	1,004128
,6	1,000540	,6	1,000895	,6	1,001357	,6	1,001920	,6	1,002578	,6	1,003326	,6	1,004158
,7	1,000550	,7	1,000909	,7	1,001374	,7	1,001941	,7	1,002602	,7	1,003352	,7	1,004187
,8	1,000560	,8	1,000923	,8	1,001391	,8	1,001961	,8	1,002625	,8	1,003379	,8	1,004216
,9	1,000570	,9	1,000937	,9	1,001409	,9	1,001982	,9	1,002649	,9	1,003405	,9	1,004245
12,0	1,000580	15,0	1,000951	18,0	1,001427	21,0	1,002002	24,0	1,002672	27,0	1,003432	30,0	1,004275
,1	1,000591	,1	1,000965	,1	1,001445	,1	1,002023	,1	1,002696	,1	1,003458		
,2	1,000601	,2	1,000979	,2	1,001462	,2	1,002044	,2	1,002720	,2	1,003485		
,3	1,000612	,3	1,000993	,3	1,001480	,3	1,002065	,3	1,002745	,3	1,003513		
,4	1,000623	,4	1,001008	,4	1,001498	,4	1,002086	,4	1,002769	,4	1,003540		
12,5	1,000634	15,5	1,001022	18,5	1,001516	21,5	1,002107	24,5	1,002793	27,5	1,003567		
,6	1,000645	,6	1,001037	,6	1,001534	,6	1,002129	,6	1,002817	,6	1,003594		
,7	1,000656	,7	1,001052	,7	1,001552	,7	1,002151	,7	1,002842	,7	1,003621		
,8	1,000668	,8	1,001067	,8	1,001570	,8	1,002172	,8	1,002866	,8	1,003649		
,9	1,000679	,9	1,001082	,9	1,001589	,9	1,002194	,9	1,002891	,9	1,003676		

Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

Federico CASTELLUCCI

Annexe IIB: DÉTERMINATION DU TITRE ALCOOMETRIQUE VOLUMIQUE REEL DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITI-VINICOLE PAR DENSIMÉTRIE ÉLECTRONIQUE (PRINCIPE DE LA MESURE DE LA FRÉQUENCE D'OSCILLATION DE LA CELLULE D'UN RÉSONATEUR DE FLEXION)

Méthode de type II

Année : 2009

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.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 5 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 ($\pm 0,02$ °C) 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 °C peut entraîner une variation de masse volumique de l'ordre de 0.0001 g/mL.

B.3.3 Seringues d'injection d'échantillons, échantillonneur automatique ou autre système équivalent.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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 laboratoire 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, d'un échantillonneur automatique ou autre système équivalent) 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 °C en fonction de la masse volumique à 20 °C des mélanges hydroalcooliques est la table internationale adoptée par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa recommandation n° 22 (Table IVa).

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, sur des boissons spiritueuses diverses, réalisée conformément aux procédures établies au niveau international.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Année de l'essai interlaboratoire	1997
Nombre de laboratoires	16
Nombre d'échantillons	6

Échantillons	A	B	C
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	11	13	15
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	2	3	1
Nombre de résultats acceptés	22	26	30
Valeur moyenne (\bar{x}) % vol.	23,81	40,12	40,35
	26,52*		
Écart-type de répétabilité (s_r) % vol	0,044	0,046	0,027
Écart-type relatif de répétabilité (RSD _r) (%)	0,17	0,12	0,07
Limite de répétabilité (r) % vol	0,12	0,13	0,08
Écart-type de reproductibilité (s_R) % vol	0,054	0,069	0,083
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD _R) (%)	0,21	0,17	0,21
Limite de reproductibilité (R) % vol	0,15	0,19	0,23

Types d'échantillons

A Liqueur de fruit; doubles avec une teneur différente*

B Brandy; doubles en aveugle

C Whisky; doubles en aveugle

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Échantillons	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	16	14	13
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	-	1	2
Nombre de résultats acceptés	32	28	26
Valeur moyenne (\bar{x}) % vol.	39,27	42,39	56,99
	43,10*	45,91*	63,31*
Écart-type de répétabilité (s_r) % vol	0,079	0,172	0,144
Écart-type relatif de répétabilité (RSD _r) (%)	0,19	0,39	0,24
Limite de répétabilité (r) % vol	0,22	0,48	0,40
Écart-type de reproductibilité (s_R) % vol	0,141	0,197	0,205
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD _R) (%)	0,34	0,45	0,34
Limite de reproductibilité (R) % vol	0,40	0,55	0,58

Types d'échantillons

D Grappa; doubles avec une teneur différente*

E Aquavit; doubles avec une teneur différente*

F Rhum; doubles avec une teneur différente*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

**Annexe IIC: DETERMINATION DU TITRE ALCOOMETRIQUE VOLUMIQUE
REEL DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITI-VINICOLE PAR
DENSIMETRIE SUR BALANCE HYDROSTATIQUE**

**Méthode de type II
Année : 2009**

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 °C, étalonné à 0,05 °C près.

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 dans le Recueil des méthodes d'analyse des vins et des moûts de l'OIV.

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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 °C, mais se situera de préférence à 20 °C.

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 °C, mais se situera de préférence à 20 °C.

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 °C (ρ_t).

C.4.4.3 Corriger ρ_t à l'aide de la table des masses volumiques ρ_T des mélanges hydroalcooliques dans le Recueil des méthodes d'analyse des vins et des moûts de l'OIV.

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 °C en fonction de la masse volumique à 20 °C des mélanges hydroalcooliques est la table internationale adoptée par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa recommandation n° 22.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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, sur des boissons spiritueuses diverses, réalisée conformément aux procédures établies au niveau international.

Année de l'essai interlaboratoire	1997
Nombre de laboratoires	12
Nombre d'échantillons	6

Échantillons	A	B	C
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	12	10	11
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	-	2	1
Nombre de résultats acceptés	24	20	22
Valeur moyenne (\bar{x}) % vol.	23,80	40,09	40,29
	26,51*		
Écart-type de répétabilité (s_r) % vol.	0,048	0,065	0,042
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	0,19	0,16	0,10
Limite de répétabilité (r) % vol.	0,13	0,18	0,12
Écart-type de reproductibilité (s_R) % vol.	0,060	0,076	0,073
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	0,24	0,19	0,18
Limite de reproductibilité (R) % vol.	0,17	0,21	0,20

Types d'échantillons

A Liqueur de fruit; doubles avec une teneur différente*

B Brandy; doubles en aveugle

C Whisky; doubles en aveugle

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Échantillons	D	E	F
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	12	11	9
Nombre de résultats aberrants (laboratoires)	-	1	2
Nombre de résultats acceptés	24	22	18
Valeur moyenne (\bar{x}) % vol.	39,26	42,38	57,16
	43,09*	45,89*	63,44*
Écart-type de répétabilité (s_r) % vol.	0,099	0,094	0,106
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	0,24	0,21	0,18
Limite de répétabilité (r) % vol.	0,28	0,26	0,30
Écart-type de reproductibilité (s_R) % vol.	0,118	0,103	0,125
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	0,29	0,23	0,21
Limite de reproductibilité (R) % vol.	0,33	0,29	0,35

Types d'échantillons

D Grappa; doubles avec une teneur différente*

E Aquavit; doubles avec une teneur différente*

F Rhum; doubles avec une teneur différente*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

DÉTERMINATION DE L'EXTRAIT SEC TOTAL DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE PAR GRAVIMÉTRIE

Méthode de type II
Année : 2009

1. Champ d'application

Cette méthode convient pour la détermination de l'extrait sec des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole contenant moins de 15 g/L de matières sèches.

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 en inox à fond plat de dimensions permettant d'éviter des pertes de liquide lors de l'évaporation.

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 dans une capsule cylindrique (5.1), 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.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

7.2 Terminer la dessiccation en plaçant la capsule dans une étuve à $105\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ 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, sur des boissons spiritueuses diverses, réalisée conformément aux procédures établies au niveau international.

Année de l'essai interlaboratoire	1997
Nombre de laboratoires	10
Nombre d'échantillons	4

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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

10. Bibliographie

Réglement (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, *J.O.C.E. du 29 décembre 2000, L333/20*

P. Brereton, S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski, C. Guillou, Analytical methods for the determination of spirit drinks, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, No. 1, 19-25, 2003

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

DETERMINATION DES PRINCIPALES SUBSTANCES VOLATILES DANS LES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITI-VINICOLE

Méthode de type II
Année : 2009

1. Champ d'application

Cette méthode convient pour la détermination dans les boissons spiritueuses d'origine vitivinicole des composés suivants: éthanal (acétaldéhyde) libre et total (obtenu par la somme de l'éthanal et de la fraction éthanal contenue dans 1,1-diéthoxyéthane), éthanoate d'éthyle (acétate d'éthyle), 1,1-diéthoxyéthane (acétal), méthanol (alcool méthylique), butan-2-ol (sec-butanol), propan-1-ol (n-propanol), 2-méthylpropan-1-ol (alcool isobutylique), butan-1-ol (n-butanol), 2-méthylbutan-1-ol (alcool amylique actif) et 3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique).

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.

4. Principe

Les substances cogénérées sont déterminées par injection directe de la boisson spiritueuse, ou de la boisson spiritueuse convenablement diluée, ou son distillat, 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.

Remarque : les concentrations des analytes sont exprimées en grammes par hectolitre d'alcool absolu; le titre alcoométrique du produit doit être déterminé avant l'analyse.

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

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 doivent être stockés selon les spécifications du fournisseur.

- 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 Etalons internes acceptables : pentan-3-ol (CAS 584-02-1), pentan-1-ol (CAS 71-41-0), 4-méthylpentan-1-ol (CAS 626-89-1), 4-méthylpentan-2-ol (CAS 108-11-2), 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 distillé et bien mélanger.

5.14 Préparation et conservation des solutions titrées (procédure suggérée pour la méthode validée : les gammes d'étalonnage doivent être adaptées à la nature des types de boissons analysées par chaque laboratoire)

Toutes les solutions titrées doivent être stockées à une température inférieure à 5 °C et être renouvelées tous les mois, si nécessaire. 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
Butan-1-ol (5.9)	3,0
Butan-2-ol (5.10)	3,0
Acétaldéhyde (5.11)	3,0
Acétal (5.12)	3,0

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

REMARQUE - Il est préférable d'ajouter l'acétal et l'acétaldéhyde en dernier lieu afin de minimiser les pertes par évaporation. Les solutions peuvent être préparées individuellement, et la solution finale et ses dilutions préparées ultérieurement.

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 et un contrôle de qualité effectif, préparer un étalon de contrôle de la qualité à l'aide de l'étalon A précédemment préparé (5.14.1) ou, de préférence, préparer un étalon de contrôle selon les indications de l'étalon A en utilisant des lots ou des marques de réactifs différents. 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.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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 de pic.
- 6.4 Colonne(s) de chromatographie en phase gazeuse permettant de séparer les analytes de sorte que, à titre indicatif, 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, dans le cas où la simple visualisation du chromatogramme n'est pas suffisante.

REMARQUE - Les colonnes et conditions CPG ci-après sont données à titre d'exemple.

- 1 Colonne de garde de 1 m x 0,32 mm de diamètre intérieur, connecté à une colonne CP-WAX 57 CB de 50 m x 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 x 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 °C pendant 17 min, 35 à 70 °C à 12 °C/min, maintenir à 70 °C pendant 25 min.
Température de l'injecteur: 150 °C
Température du détecteur: 250 °C
Volume d'injection: 1 μl , split 20 à 100:1

- 2 Colonne de garde de 1 m x 0,32 mm de diamètre intérieur, connecté à une colonne CP-WAX 57 CB de 50 m x 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 °C pendant 10 min, 35 à 110 °C à 5 °C/min, 110 à 190 °C à 30 °C/min, maintenir à 190 °C pendant 2 min.
Température de l'injecteur: 260 °C
Température du détecteur: 300 °C
Volume d'injection: 1 μl , split 55:1

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

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

7. Échantillonnage et échantillons

7.1 Échantillon de laboratoire

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

8. Mode opératoire (procédure utilisée pour la méthode validée, et donnée à titre d'exemple ; le mode opératoire précis, et en particulier la gamme d'étalonnage, devront être adaptée à la nature des échantillons analysés et aux procédures validées par chaque laboratoire)

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 ($M_{\text{ÉCHANTILLON}}$).

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 20 retournements). Les échantillons doivent être stockés à une température inférieure à 5 °C 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 20 retournements). Les échantillons doivent être stockés à une température inférieure à 5 °C 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 minimum 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 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.

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

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

8.5 Détermination

Injecter la solution titrée C (5.14.3) et 2 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 10 échantillons afin d'assurer la stabilité analytique. Injecter une solution titrée C (5.14.3) tous les 5 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 et aux bonnes pratiques de chromatographie en phase gazeuse (calcul du facteur de réponse et/ou établissement d'une courbe d'étalonnage).

Mesurer les aires 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).

$$(1) \text{ Facteur de réponse} = \frac{\text{Aire de pic IS}}{\text{Aire de pic substance}} \times \frac{\text{Conc. substance } (\mu\text{g} / \text{g})}{\text{Conc. IS } (\mu\text{g} / \text{g})}$$

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)

9.2 Analyse de l'échantillon

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

$$(2) \text{ Concentrations des substances } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Aire de pic substance}}{\text{Aire de pic IS}} \times \frac{M_{\text{IS}} (\text{g})}{M_{\text{ÉCH}} (\text{g})} \times \text{Conc. IS } (\mu\text{g} / \text{g}) \times \text{RF}$$

où:

$M_{\text{ÉCH}}$ = 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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

9.3 Analyse de la solution titrée de contrôle de la qualité

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

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

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

9.4 Présentation finale des résultats

Pour les échantillons, les résultats sont convertis de $\mu\text{g/g}$ en g par hectolitre d'alcool absolu à l'aide de l'équation (4). :

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

$$= \text{Conc} (\mu\text{g/g}) \times \rho \times 10 / (\text{titre}(\% \text{ vol.}) \times 1000)$$

où ρ = masse volumique en kg/m^3 .

Les résultats sont exprimés avec 3 chiffres significatifs au maximum et une décimale au maximum, par exemple 11,4 g par hectolitre d'alcool absolu.

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

À l'aide de l'équation (2) ci-dessus, 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 $\pm 10\%$ 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)

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

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}) $\mu\text{g/g}$.	63,4	71,67	130,4	38,4	28,6
				13,8*	52,2*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	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) ($\mu\text{g/g}$.	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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}) $\mu\text{g/g}$.	96,8	1046	120,3	112,5	99,1
				91,8*	117,0*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	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
Limite de répétabilité (r) $\mu\text{g/g}$.	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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}) $\mu\text{g/g}$.	35,04	36,46	68,5	20,36	15,1
				6,60*	28,3*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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

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}) $\mu\text{g/g}$.	76,5	85,3	156,5	45,4	32,7
				15,8*	61,8*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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}) $\mu\text{g/g}$.	319,8	2245	1326	83,0, 61,5*	18,6, 28,9*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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}) $\mu\text{g/g}$.	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	1,1	6,1	2,5	1,8
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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}) $\mu\text{g/g}$.	86,4	354,1	159,1	272,1	177,1
				229,3*	222,1*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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
Limite de reproductibilité (R) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Année de l'essai interlaboratoire	1997
Nombre de laboratoires	32
Nombre d'échantillons	3
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}) $\mu\text{g/g}$.	3,79	5,57	7,54
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	0,43	0,20	0,43
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Limite de répétabilité (r) $\mu\text{g/g}$.	1,1	0,6	1,2
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	0,59	0,55	0,82
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	15,7	9,8	10,8
Limite de reproductibilité (R) $\mu\text{g/g}$.	1,7	1,5	2,3

Types d'échantillons

A Brandy; doubles en aveugle

B Kirsch; doubles en aveugle

C Grappa; doubles en aveugle*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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}) $\mu\text{g/g}$.	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8*	133,87*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Limite de répétabilité (r) $\mu\text{g/g}$.	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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}) $\mu\text{g/g}$.	113,0	48,3	91,6	72,1	39,5
				45,2*	61,5*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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

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}) $\mu\text{g/g}$.	459,4	242,7	288,4	142,2	212,3
				120,4*	245,6*
Écart-type de répétabilité (s_r) $\mu\text{g/g}$.	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Limite de répétabilité (r) $\mu\text{g/g}$.	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Écart-type de reproductibilité (s_R) $\mu\text{g/g}$.	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) $\mu\text{g/g}$.	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 Rhum; doubles avec une teneur différente*

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

12. Bibliographie

Réglement (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, *J.O.C.E. du 29 décembre 2000, L333/20*

P. Brereton, S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski, C. Guillou, Analytical methods for the determination of spirit drinks, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, No. 1, 19-25, 2003

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

ANÉTHOLE. DOSAGE DU TRANS-ANÉTHOLE DANS LES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Méthode de type II
Année : 2009

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°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 doit être «décongelé» de son état cristallin avant emploi, mais il ne doit en aucun cas être soumis à des températures excédant 35°C.

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°C) et à l'abri de la lumière, dans des récipients en aluminium ou des flacons spéciaux pour réactifs en

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

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

4.5.2 Solution étalon interne B

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

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. (voir 4.1) et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol. (voir 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 0g/l à 2,5g/l. Lors de la procédure d'analyse, les échantillons inconnus de spiritueux à analyser sont dilués dix fois (voir 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 (voir 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 (voir 4.5.2) et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol. (voir 4.4). Mélanger soigneusement.

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

4.5.4 Solution étalon C

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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 en 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 °C

6.4 température du détecteur: 250 °C

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

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

7. Echantillons

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

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. (voir 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 (voir 4.5.2) et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol. (voir 4.4). Mélanger soigneusement.

8.3 Analyse témoin

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Introduire à la pipette 2 ml de solution étalon interne B (voir 4.5.2) dans une fiole jaugée de 20 ml et porter au volume à l'aide d'éthanol à 45 % vol. (voir 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 (voir 4.5.3).

À partir des aires 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.

$R = \text{aire de pic du trans-anéthole} / \text{aire de pic de l'estragole}$.

On doit obtenir un tracé linéaire.

8.5 Détermination

Injecter la solution témoin (voir 8.3), puis la solution étalon C (voir 4.5.4), puis l'un des étalons de linéarité (voir 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 (voir 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 des pics (à l'aide d'un intégrateur ou d'un autre système d'acquisition et de gestion des données) 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:

$$RF_i = (C_i / \text{aire}_i) * (\text{aire}_{is} / C_{is})$$

où:

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

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

aire_i est l'aire de pic du trans-anéthole

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

Le RF_i est calculé à partir des cinq échantillons de la solution C (voir 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 (voir 4.5.3).

9.3 Analyse de l'échantillon

Injecter la solution d'échantillon inconnu (voir 8.2)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

10. Calcul des résultats

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

$$c_i = C_{is} * (aire_i/aire_{is}) * Rf_i$$

où:

- c_i est la concentration inconnue de trans-anéthole
- C_{is} est la concentration en étalon interne de l'échantillon inconnu (voir 4.5.2)
- $aire_i$ est l'aire du pic du trans-anéthole
- $aire_{is}$ est l'aire du 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 (voir 4.5.4). Si le coefficient de variation ($CV\% = (\text{écart type}/\text{moyenne}) * 100$) se situe autour de 1 %, la valeur moyenne du facteur de réponse RF_i est acceptable.

L'équation 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 (voir 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 a 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. (voir 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.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

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.

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

Agiter la fiole pendant au moins 30 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 ($T < 5^{\circ}\text{C}$) 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 (voir 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. (voir 4.4) et mélanger soigneusement.

12.5 Détermination

Suivre la procédure exposée au point 8.5.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

12.6 Calcul des résultats

Utiliser la formule suivante pour calculer les résultats:

$$C_i = (m_{is} / V) * (aire_i / aire_{is}) * Rf_i$$

où:

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

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

RF_i est le facteur de réponse (voir 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 ci-dessus au point 11.

13. Caractéristiques de performance de la méthode (précision)

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoires

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

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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

*Exemplaire certifié conforme
 Zagreb, le 3 juillet 2009
 Le Directeur Général de l'OIV
 Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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 reproductibilité (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limite de reproductibilité (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Types d'échantillons

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

H anis, doubles en aveugle

I liqueur anisée, doubles

J liqueur anisée, doubles

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

14. BIBLIOGRAPHIE

Commission Regulation (EC) N° 2091/2002 of 26 November 2002 amending Regulation (EC) No 2870/2000 laying down Community reference methods for the analysis of spirits drinks, *OJEC of 27 November 2002, L322/11*

P. Brereton, S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski, C. Guillou, Analytical methods for the determination of spirit drinks, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, No. 1, 19-25, 2003

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*



RÉSOLUTION OIV/OENO 380/2009

ACTUALISATION DU RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE DE L'OIV - Partie 2

L'ASSEMBLEE GENERALE

VU l'article 2 paragraphe 2b iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

1.

VU les actions du plan stratégique de l'OIV 2009-2012 en particulier celle qui vise à réorganiser les publications relatives aux méthodes d'analyse vitivinicoles

CONSIDERANT les travaux de la sous-commission des méthodes d'analyse

VU l'édition de 1994 du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons

DECIDE, compte tenu de l'évolution des méthodes et de la disponibilité des paramètres de validation inter-laboratoire, de retenir et de décrire comme méthodes d'analyse de Type II, les méthodes suivantes ;

DECIDE d'incorporer ces méthodes dans la nouvelle édition du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicoles.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

DÉTERMINATION DES ACIDITÉS DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITI-VINICOLE

Méthode de type II
Année : 2009

1. Champs d'application

Cette méthode convient à la détermination des acidités volatile, totale et fixe des boissons spiritueuses d'origine viti-vinicole.

2. Références normatives

ISO 3696 : 1987 Eau pour usage analytique - caractéristiques et méthodes d'essai

3. Définitions

3.1 L'acidité volatile est constituée par les acides de la série acétique qui sont présents dans les boissons spiritueuses d'origine viti-vinicole..

3.2 L'acidité totale est la somme d'acidités titrables.

3.3 L'acidité fixe est l'acidité du résidu après avoir évaporé la boisson spiritueuse à sec.

4. Principe

L'acidité totale est déterminée par titration directe de la boisson spiritueuse. L'acidité fixe est déterminée par titration de la solution aqueuse obtenue par dissolution du résidu sec de la boisson spiritueuse. L'acidité volatile est calculée en déduisant l'acidité fixe de l'acidité totale.

5. Réactifs et matériaux

Pour l'analyse, sauf indication contraire utiliser seulement des réactifs, de catégorie analytique identifiée et de l'eau d'au moins catégorie 3 comme défini par à ISO 3696:1987

5.1 Solution d'hydroxyde de sodium 0,05 M

5.2 Solution d'indicateur mixte :

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

Dissoudre dans 40 mL d'eau et compléter à 100 mL avec de l'éthanol.

6. Appareil et équipement

Appareillage de laboratoire standard, verrerie volumétrique de catégorie A et, en particulier, ce qui suit :

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

6.1 Système de mise sous vide (trompe à eau, flacon à vide, etc), ou autre système d'élimination du dioxyde de carbone (barbotage ou autre)

6.2 Capsule cylindrique en inox à fond plat, de dimensions permettant d'éviter des pertes de liquide lors de l'évaporation.

6.3 Appareillage pour titration par potentiométrie (en option)

7. Prélèvement et échantillons

Des échantillons sont stockés à la température ambiante avant l'analyse.

8. Procédé

8.1 Acidité totale

8.1.1 Préparation d'échantillon

Si nécessaire, la boisson spiritueuse est agitée au moins deux minutes sous vide pour la débarrasser de l'anhydride carbonique, ou celui-ci est éliminé par toute autre méthode convenable.

8.1.2 Titration

Introduire à la pipette 25 mL de boisson spiritueuse dans un flacon conique de 500 mL

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

Titrer avec la solution d'hydroxyde de sodium 0,05 M (5.1) jusqu'à ce que la couleur vert-jaunâtre vire au violet dans le cas des boissons spiritueuses incolores, ou que la couleur jaune-brun vire au rouge-brun dans le cas des boissons spiritueuses colorées en brun.

La titration peut également être effectuée par potentiométrie à pH 7,5.
Soit n_1 mL le volume ajouté de la solution d'hydroxyde de sodium 0,05 M.

8.1.3 Calcul

L'acidité totale (TA) exprimée en milliéquivalents par L de la boisson spiritueuse est égale à $2 \times n_1$.

L'acidité totale (TA) exprimé en mg d'acide acétique par L de la boisson spiritueuse est égale à $120 \times n_1$.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

L'acidité totale (TA') exprimé en g d'acide acétique par hl d'alcool pur à 100 % vol. est égale à $120 \times n_1 \times 10/A$, où A est le titre alcoométrique volumique de la boisson spiritueuse.

8.2 Acidité fixe

8.2.1 Préparation d'échantillon

mL Introduire à la pipette 25 mL de boisson spiritueuse (ou un volume supérieur si l'acidité fixe est très faible) dans une capsule d'évaporation cylindrique (6.3). Pendant la première heure de l'évaporation la capsule d'évaporation est placée sur le couvercle d'un bain d'eau bouillante de sorte que le liquide ne bouille pas, car ceci pourrait entraîner des pertes en éclaboussant.

Si nécessaire, finir le séchage en plaçant la capsule d'évaporation dans une étuve à 105 °C pendant deux heures. Laisser la capsule d'évaporation se refroidir dans un dessiccateur.

8.2.2 Titration

Prendre le résidu de l'évaporation avec de l'eau distillée bouillie refroidie (préparée le jour même), compléter jusqu'à un volume d'environ 100 mL et ajouter 2-6 gouttes de la solution d'indicateur mixte (5.2).

Titrer avec la solution d'hydroxyde de sodium 0,05 M (5.1) jusqu'à ce que la couleur vert-jaunâtre vire au violet si la solution est incolore, ou que la couleur jaune-brun vire au rouge-brun si la solution est colorée en brun.

La titration peut également être effectuée par potentiométrie à pH 7,5.

Soit n_2 mL le volume ajouté de solution d'hydroxyde de sodium 0.05 M, et V mL le volume d'échantillon évaporé.

8.2.3 Calcul

L'acidité fixe (FA) exprimée en milliéquivalents par L de boisson spiritueuse est égale à $2 \times n_2 \times 25/V$.

L'acidité fixe (FA') exprimée en mg d'acide acétique par L de boisson spiritueuse est égale à $120 \times n_2 \times 25/V$.

L'acidité fixe (FA') exprimé en g d'acide acétique par hl d'alcool pur à 100 % vol. est égale à $120 \times n_2 \times 25/V \times 10/A$, où A est le titre alcoométrique volumique de la boisson spiritueuse.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

8.3 Calcul de l'acidité volatile

8.3.1 Expression en milliéquivalents par L :

Soit:

TA = acidité totale en milliéquivalents par L

FA = acidité fixe en milliéquivalents par L

L'acidité volatile, VA, en milliéquivalents par L est égale à :

$$TA - FA$$

8.3.2 Expression en mg d'acide acétique par L :

Soit

TA' = acidité totale en mg d'acide acétique par L

FA' = l'acidité fixe en mg d'acide acétique par L

L'acidité volatile, VA, en mg d'acide acétique par L est égale à :

$$TA' - FA'$$

8.3.3 L'expression en g d'acide acétique par hl d'alcool pur à 100 % vol. est égale à :

$$\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$$

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

9. Caractéristiques de performance de la méthode (précision)

Les données suivantes ont été obtenues en 2000 à partir d'une étude internationale de performance de la méthode sur des boissons spiritueuses diverses, effectuée selon les procédures internationalement reconnues.

Légende des tableaux :

nLT	Nombre de laboratoires (2 résultats par laboratoires)
nL	Nombre de laboratoires pour estimer les limites de fidélité
r	limite de répétabilité
Sr	écart type de répétabilité
RSDr	écart type de répétabilité en % du niveau
R	limite de reproductibilité

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

SR	écart type de reproductibilité
RSDR	écart type de reproductibilité en % du niveau
PRSDR	RSDR estimé avec l'équation d'Horwitz
HoR	HorRat = RSDR / PRSDR
SH240	Solution hydroalcoolique: acide acétique (240 mg/L), acide tartrique (200 mg/L), saccharose (10 g/L)

Tous les acidités sont exprimés en mg d'acide acétique par L de boisson spiritueuse.

9.1 Acidité totale

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Rhum	18	18	53	8	2.7	5.1	34	12	23	8.8	2.6
Slibowitz	18	17	55	10	3.7	6.7	19	6.6	12	8.8	1.4
Brandy	20	18	193	16	5.7	2.9	43	15	7.9	7.2	1.1
Brandy	18	18	194	16	5.8	3.0	38	13	6.9	7.2	1.0
Calvados	18	17	282	21	7.5	2.7	34	12	4.3	6.8	0.6
SH240	20	17	400	14	4.9	1.2	18	6.2	1.6	6.5	0.2
Marc	18	18	547	16	5.8	1.1	42	15	2.7	6.2	0.4
Armagnac	20	19	580	27	9.4	1.6	53	19	3.2	6.1	0.5
Rhum	18	18	641	41	14.3	2.2	66	23	3.7	6.0	0.6

9.2 Acidité fixe

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Slibowitz	18	16	9.5	5.1	1.8	19	14	4.9	52	11	4.6
Rhum	18	18	22	6.1	2.2	9.7	28	10	45	10	4.5
Calvados	18	16	25	7.7	2.7	10.8	24	8.4	34	9.9	3.4
Rhum	18	18	25	5.7	2.0	7.9	28	9.9	39	9.8	4.0
Marc	18	17	51	25	8.8	17	60	21	42	8.8	4.7
Brandy	18	18	87	17	6.0	6.9	47	17	19	8.2	2.3
Brandy	20	19	89	12	4.2	4.7	33	12	13	8.1	1.6
Armagnac	20	19	159	13	4.7	2.9	80	28	18	7.5	2.4
SH240	20	17	162	12	4.1	2.5	32	11	7.1	7.4	1.0

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

9.3 Acidité volatile

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Rhum	18	18	30	10	3.5	12	24	8.4	28	9.6	2.9
Slibowitz	18	14	46	10	3.7	8.1	13	4.6	10	9.0	1.1
Brandy	20	18	107	23	8.0	7.5	44	16	15	7.9	1.8
Brandy	18	18	107	19	6.6	6.2	38	13	13	7.9	1.6
SH240	20	17	242	21	7.2	3.0	48	17	6.9	7.0	1.0
Calvados	18	16	257	23	8.0	3.1	24	8.5	3.3	6.9	0.5
Armagnac	20	17	418	22	7.8	1.9	62	22	5.2	6.5	0.8
Marc	18	18	492	24	8.5	1.7	69	24	5.0	6.3	0.8
Rhum	18	18	616	42	15	2.4	71	25	4.1	6.1	0.7

10. Bibliographie

R. Wittkowski, A. Bertrand, P. Brereton, C. Guillou, 2000. PROJECT SMT4-CT96-2119, Validation of analytical methods of analysis for spirit drinks. REPORT NO. 02/08-WORKSTREAM 8

P. Brereton, S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski, C. Guillou, Analytical methods for the determination of spirit drinks, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No. 1, 19-25, 2003

FV 1322 (2009), Mesure des acidités dans les spiritueux - estimation des valeurs de fidélité

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

DETERMINATION DES SUCRES DANS DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITI-VINICOLE

Méthode de type II
Année : 2009

Introduction

Les boissons spiritueuses d'origine viti-vinicole peuvent être édulcorées par divers composés, et il existe dans certaines réglementations des limitations de l'édulcorant à des niveaux minimum ou maximum.

1. Portée

Cette méthode convient à la détermination de la teneur en glucose, en fructose, et en saccharose des boissons spiritueuses d'origine viti-vinicole. Il ne convient pas aux boissons contenant des produits laitiers ou des œufs.

2. Références Normatives

ISO 3696,1897 Eau pour usage analytique - Caractéristiques et méthodes d'essai.

3. Principe

Analyse par chromatographie liquide à hautes performances (CLHP), afin de déterminer les concentrations en glucose, en fructose, et en saccharose.

Cette méthode est décrite comme exemple. Elle emploie une phase stationnaire d'alkylamine et une détection par réfractométrie différentielle. D'autres colonnes/détecteurs peuvent être employés, par exemple des résines échangeuses d'anions comme phase stationnaire.

4. Réactifs et produits

4.1 Glucose (CAS 50-99-7), au moins 99% de pureté.

4.2 Fructose (CAS 57-48-7), au moins 99% de pureté.

4.3 Saccharose (CAS 57-50-1), au moins 99% de pureté.

4.4 Acétonitrile pur (CAS 75-05-8) pour l'analyse par CLHP.

L'acétonitrile est un liquide fortement inflammable. Il est toxique par inhalation, en contact avec la peau et par absorption. Il est irritant pour les yeux.

4.5 Eau distillée ou déminéralisée, microfiltrée de préférence.

4.6 Solvants (exemple)

Le solvant d'élution est préparé au préalable par mélange de :

75 parts par volume d'acétonitrile (4.4),

25 parts par volume d'eau distillée (4.5).

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

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

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

4.7 Ethanol absolu (CAS 64-17-5).

4.8 Solution d'éthanol (5 %, v/v).

4.9 Préparation des solutions mères de calibration (20g/L)

Peser 2 g de chacun des sucres à analyser (4.1 à 4.3), les transférer sans perte dans un ballon jaugé de 100 mL. Ajuster à 100 mL avec une solution d'alcool à 5% vol. (4.8), agiter et stocker à environ + 4°C. Préparer une nouvelle solution mère une fois par semaine si nécessaire.

4.10 Préparation des solutions filles de calibration (2,5 - 5,0 - 7,5 - 10,0 et 20,0 g/l)

Diluer la solution mère à 20 g/l, (4.9) convenablement avec une solution d'alcool de 5 % vol. (4.8) pour donner cinq solutions standards de 2,5 - 5,0 - 7,5 - 10,0 et 20,0 g/l. Filtrer avec un filtre de diamètre de pores inférieur ou égal à 0,45 µm (5.3.).

5. Appareillage et équipement (exemple - d'autres systèmes qui donnent un résultat équivalent peuvent être employés)

Appareillage de laboratoire standard, verrerie volumétrique de catégorie A et, en particulier, ce qui suit :

5.1. *Système CLHP capable de réaliser le retour à la ligne de base lors de l'analyse de tous les sucres.*

5.1.1 Chromatographe liquide à hautes performances avec une vanne d'injection six-voies équipée d'une boucle de 10 µL ou de tout autre dispositif automatique ou manuel, pour l'injection fiable de microvolumes.

5.1.2. Système de pompage permettant de réaliser et maintenir un débit constant ou programmé avec une grande précision.

5.1.3. Réfractomètre différentiel.

5.1.4. Intégrateur ou enregistreur informatique compatible avec le reste de l'installation.

5.1.5. Pré-colonne :

On recommande qu'une pré-colonne appropriée soit placée avant à la colonne analytique.

5.1.6. Colonne (exemple) :

Matériel : acier inoxydable ou verre

Diamètre interne : 2-5 millimètres

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Longueur : 100-250 millimètres (variable en fonction de la taille des particules), par exemple, 250 millimètres si les particules sont de 5 µm de diamètre

Phase stationnaire : silice greffée avec des radicaux contenant le groupement fonctionnel alkylamine, diamètre maximum des particules 5 µm.

5.1.7. Conditions chromatographiques (exemple) :

Solvant d'élution (4.6), débit : 1 mL/minute

Détection : Réfractométrie différentielle

Pour s'assurer que le détecteur est parfaitement stable, il peut être recommandé de le mettre en marche quelques heures avant l'emploi. La cellule de référence doit être remplie avec du solvant d'élution.

5.2. Balance analytique précise à 0,1 mg.

5.3. Système de filtration pour des petits volumes utilisant une micromembrane de 0,45 µm de diamètre de pores.

6. Stockage des échantillons

Lors de leur réception, les échantillons doivent être stockés à la température ambiante avant l'analyse.

7. Procédure analytique

7.1. Partie A : Préparation des échantillons

7.1.1. Agiter l'échantillon.

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

7.2. Partie B : CLHP

7.2.1. Détermination

Injecter 10 µL des solutions d'étalonnage (4.10) et les échantillons (7.1.2.). Effectuer l'analyse dans des conditions appropriées de chromatographie, par exemple comme indiquées ci-dessus.

7.2.2. Si n'importe quel pic d'un échantillon possède une surface (ou hauteur) plus grande que le pic correspondant dans la solution d'étalonnage la plus concentrée, alors l'échantillon devra être dilué avec de l'eau distillée et être analysé de nouveau.

8. Calcul

Comparer les deux chromatogrammes obtenus pour la solution étalon et la boisson spiritueuse. Identifier les pics par leur temps de rétention. Mesurer leur surface (ou hauteur) pour calculer les concentrations par la méthode de l'étalonnage externe. Tenir compte de toutes les dilutions faites durant la préparation de l'échantillon.

Le résultat final est par convention la somme de saccharose, de glucose et de fructose, en g/l.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

9. Caractéristiques de performance de la méthode (précision)

Les données suivantes ont été obtenues en 2000 à partir d'une étude internationale de performance de la méthode sur des boissons spiritueuses diverses, effectuée selon les procédures internationalement reconnues.

Légende des tableaux :

nLT	Nombre de laboratoires (2 résultats par laboratoires)
nL	Nombre de laboratoires pour estimer les limites de fidélité
r	limite de répétabilité
Sr	écart type de répétabilité
RSDr	écart type de répétabilité en % du niveau
R	limite de reproductibilité
SR	écart type de reproductibilité
RSDR	écart type de reproductibilité en % du niveau
HoR	HorRat = RSDR / PRSDR

9.1 Glucose

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	HoR
Liqueur 1	26	24	92.4	5.4	1.9	2.1	13	4.8	5.2	1.8
Liqueur 2	24	23	93.2	9.7	3.5	3.7	28	10	11	3.8

9.2 Fructose

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	HoR
Liqueur 1	26	22	87	3.2	1.2	1.3	8.5	3.0	3.5	1.2
Liqueur 2	24	21	93	6.6	2.3	2.5	22	7.7	8.3	2.9

9.3 Saccharose

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	HoR
Liqueur 1	26	24	174	12	4.2	2.4	24	8.7	5.0	1.9
Liqueur 2	24	18	320	12	4.3	1.3	45	16	5.0	2.1
Liqueur 3	24	18	349	22	8.0	2.3	30	11	3.1	1.3
Pastis	24	19	11	0.2	0.1	0.8	2.2	0.8	7.3	1.9
Ouzo	24	19	24	2.1	0.8	3.1	2.6	0.9	3.8	1.1
Kirsch	24	20	103	6.1	2.2	2.1	12	4.2	4.0	1.4

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

9.4 Sucres totaux

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	HoR
Liqueur 1	26	21	353	8.7	3.1	0.9	41	15	4.2	1.8
Liqueur 2	24	18	510	16	5.6	1.1	41	15	2.9	1.3
Liqueur 3	24	18	349	22	8.0	2.3	30	11	3.1	1.3
Pastis	24	20	11	0.4	0.1	1.2	2.2	0.8	7.3	1.8
Ouzo	24	19	24	2.1	0.8	3.1	2.6	0.9	3.8	1.1
Kirsch	24	20	103	6.1	2.2	2.1	12	4.2	4.0	1.4

10. Bibliographie

R. Wittkowski, A. Bertrand, P. Brereton, C. Guillou, 2000. PROJECT SMT4-CT96-2119, Validation of analytical methods of analysis for spirit drinks. REPORT NO. 02/09 - WORKSTREAM 10.

P. Brereton, S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski, C. Guillou, Analytical methods for the determination of spirit drinks, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No. 1, 19-25, 2003.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 381/2009

ACTUALISATION DU RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLES – PARTIE 3

L'ASSEMBLEE GENERALE

VU l'article 2 paragraphe 2b iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

VU les actions du plan stratégique de l'OIV 2005-2008 en particulier celle qui vise à réorganiser les publications relatives aux méthodes d'analyse vitivinicoles

CONSIDERANT les travaux de la sous-commission des méthodes d'analyse

VU l'édition de 1994 du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons

VU le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts

CONSIDERANT que les méthodes décrites ci-dessous sont également décrites dans le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts avec des paramètres de validation interlaboratoires.

CONSIDERANT que le principe de ces méthodes réside en une mesure des paramètres concernés sur la fraction d'éthanol obtenue ;

DECIDE d'incorporer ces méthodes dans la nouvelle édition du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicoles.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Détermination par spectrométrie de masse isotopique du rapport d'isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole

Méthode de type II
Année : 2009

1. CHAMP D'APPLICATION

La méthode permet la mesure du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

2. REFERENCES NORMATIVES

ISO 5725 : 1994 « Fidélité des méthodes d'essai- Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires. »

V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite ($R_{\text{PDB}} = 0,0112372$).

Méthode OIV «Détection de l'enrichissement des moûts , des moûts concentrés, du sucre de raisin et des vins par application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS): »

3. TERMES ET DEFINITIONS

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: rapport des isotopes du carbone 13 et du carbone 12 pour un échantillon donné

$\delta^{13}\text{C}$: teneur en carbone 13 (^{13}C) exprimée en parties pour mille (‰)

RMN-FINS : Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire

V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite. Le PDB, référence primaire pour la mesure des variations naturelles des teneurs isotopiques en carbone 13, était un carbonate de calcium provenant d'un rostre de bélemnite du Crétacé de la formation Peedee de la Caroline du sud (USA). Son rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou R_{PDB} est

$R_{\text{PDB}} = 0,0112372$. Le PDB est épuisé depuis longtemps mais est resté la référence primaire pour exprimer les variations naturelles des teneurs isotopiques en carbone 13, contre laquelle sont calibrés les matériaux de référence, disponibles à l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA) à Vienne (Autriche).

Les déterminations isotopiques des abondances naturelles en carbone 13 sont alors exprimées, par convention, par rapport au V-PDB.

m/z : rapport masse sur charge

4. PRINCIPE

Lors de la photosynthèse, l'assimilation du gaz carbonique par les végétaux s'effectue selon deux principaux types de métabolismes qui sont les métabolismes C_3 (cycle de Calvin) et C_4 (Hatch et Slack). Ces deux mécanismes de photosynthèse présentent un fractionnement isotopique différent. Ainsi, les produits issus des plantes C_4 , tel que les sucres et l'alcool

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

dérivé par fermentation, présentent des teneurs en carbone 13 plus élevées que celles de leurs homologues provenant des plantes C₃. La plupart des végétaux tels que la vigne et la betterave, appartiennent au groupe C₃. La canne à sucre et le maïs appartiennent au groupe C₄. La mesure de la teneur en carbone 13 permet donc la détection et la quantification du sucre d'origine C₄ (sucre de canne ou l'isoglucose de maïs) ajouté aux produits dérivés du raisin (moûts de raisins, vins...). Les informations combinées de la teneur en carbone 13 avec celles obtenues par RMN-FINS permettent également la quantification de l'addition de mélanges de sucres ou d'alcools d'origine des plantes C₃ et C₄.

La teneur en carbone 13 est déterminée sur le gaz carbonique résultant de la combustion complète de l'échantillon. Les abondances des principaux isotopomères de masses 44 (¹²C¹⁶O₂), 45 (¹³C¹⁶O₂ et ¹²C¹⁷O¹⁶O) et 46 (¹²C¹⁶O¹⁸O), résultant des différentes combinaisons possibles des isotopes ¹⁸O, ¹⁷O, ¹⁶O, ¹³C et ¹²C, sont déterminées à partir des courants ioniques mesurés sur trois collecteurs différents d'un spectromètre de masse isotopique. Les contributions des isotopomères ¹³C¹⁷O¹⁶O et ¹²C¹⁷O₂ peuvent être négligées en raison de leur très faible abondance. Le courant ionique pour m/z = 45 est corrigé de la contribution de ¹²C¹⁷O¹⁶O qui est calculée en fonction de l'intensité du courant mesuré pour m/z = 46 en considérant les abondances relatives de ¹⁸O et ¹⁷O (correction de Craig). La comparaison avec une référence calibrée contre la référence internationale V-PDB permet le calcul de la teneur en carbone 13 sur l'échelle relative δ¹³C.

5. REACTIFS

Les matériaux et les consommables dépendent de l'appareillage (6) utilisé par le laboratoire. Les systèmes généralement utilisés sont ceux fondés sur l'analyseur élémentaire. Celui ci peut être équipé pour l'introduction d'échantillons placés dans des capsules métalliques scellées, ou pour l'injection d'échantillons liquides à travers un septum au moyen d'une seringue.

Selon le type d'instrumentation utilisé, les matériaux de référence, réactifs et consommables suivants peuvent être utilisés :

- Matériaux de référence disponibles auprès de l'IAEA :

Nom	Matériel	δ ¹³ C versus V-PDB (9)
- IAEA-CH-6	saccharose	-10,4 ‰
-IAEA-CH-7	polyéthylène	-31,8 ‰
- NBS22	huile	-29,7 ‰
- USGS24	graphite	-16,1 ‰

disponibles auprès de l'IRMM de Geel (B) (Institut des Matériaux et Mesures de Référence) :

Nom	Matériel	δ ¹³ C versus V-PDB (9)
- CRM 656	alcool de vin	-26,93 ‰
- CRM 657	glucose	-10,75 ‰
- CRM 660	solution hydroalcoolique (TAV 12%)	-26,72 ‰

Echantillon standard de travail ayant un rapport ¹³C/¹²C connu calibré contre les matériaux de référence internationaux.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

La liste indicative de consommables ci-dessous est établie pour les systèmes à flux continu :

- Hélium pour analyse (CAS 07440-59-7)
- Oxygène pour analyse (CAS 07782-44-7)
- Dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire pour la teneur en carbone 13 (CAS 00124-38-9)
- Réactif d'oxydation pour le four du système de combustion comme par exemple oxyde de cuivre (II) pour analyse élémentaire (CAS 1317-38-0)
- Desséchant pour éliminer de l'eau produite par la combustion. Par exemple anhydronne pour analyse élémentaire (perchlorate de magnésium) (CAS 10034-81-8).

Non nécessaire pour les appareillages équipés avec un système d'élimination de l'eau par cryopiéage ou au moyen d'un capillaire sélectivement perméable.

6. APPAREILLAGE ET MATERIEL

6.1. Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI)

Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI), permettant de déterminer la teneur relative de ^{13}C du gaz CO_2 en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰ ou mieux exprimée en valeur relative (9). La précision interne est ici définie comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2 . Le spectromètre de masse, destiné à la mesure des rapports isotopiques, est généralement équipé d'un collecteur triple pour mesurer simultanément les intensités pour $m/z = 44, 45$ et 46 . Le spectromètre de masse de rapport isotopique doit, soit être équipé d'un système d'introduction double, pour mesurer en alternance l'échantillon inconnu et un échantillon de référence, soit utiliser un système intégré qui effectue la combustion quantitative des échantillons et sépare le dioxyde de carbone des autres produits de combustion préalablement à la mesure dans le spectromètre de masse.

6.2. Appareillage de combustion

Appareillage de combustion capable de convertir quantitativement l'éthanol en dioxyde de carbone et d'éliminer tous les autres produits de combustion y compris l'eau sans aucun fractionnement isotopique. L'appareillage peut être, soit un système à flux continu intégré à l'instrumentation de spectrométrie de masse (6.2.1), soit un système de combustion autonome (6.2.2). L'appareillage doit permettre d'obtenir une précision au moins équivalente à celle indiquée en (11).

6.2.1. Systèmes à flux continu

Ceux-ci sont constitués soit par un analyseur élémentaire, soit par un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un système de combustion en ligne.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Pour les systèmes équipés pour l'introduction des échantillons contenus dans des capsules métalliques, le matériel de laboratoire suivant est utilisé :

- micropipette volumétrique avec cônes appropriés
- balance à 1 µg de précision ou mieux
- pince pour encapsulage
- capsules d'étain pour échantillons liquides
- capsules d'étain pour échantillons solides

Lors de l'utilisation d'un analyseur élémentaire équipé d'un injecteur pour liquides ou dans le cas d'un système de préparation par chromatographie-combustion, le matériel de laboratoire suivant est utilisé :

- seringue pour liquides
- flacons équipés d'un système de fermeture étanche et de septa inertes.

Les matériels de laboratoire indiqués dans les listes ci-dessus constituent des exemples et sont susceptibles d'être remplacés par d'autres matériels de performances équivalentes selon le type d'appareillage de combustion et de spectrométrie de masse utilisé par le laboratoire.

6.2.2. Systèmes autonomes de préparation

Dans ce cas, les échantillons de dioxyde de carbone résultant de la combustion des échantillons à analyser et de la référence sont collectés dans des ampoules qui sont ensuite installées au double système d'entrée du spectromètre pour réaliser l'analyse isotopique. Plusieurs types d'appareillages de combustion décrits dans la littérature sont utilisables:

- Système clos de combustion rempli avec du gaz oxygène circulant
- Analyseur élémentaire avec flux d'hélium et d'oxygène
- Ampoule scellée en verre remplie avec de l'oxyde de cuivre (II) comme agent d'oxydation

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR ESSAI

L'éthanol doit être extrait à partir de la boisson spiritueuse avant détermination isotopique. Cette extraction est effectuée par la distillation de la boisson comme décrit dans §3.1 de la méthode RMN-FINS pour la détermination par RMN de la distribution de deutérium dans l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

8. MODE OPERATOIRE

Toutes les étapes préparatoires doivent être effectuées sans aucune perte significative d'éthanol par évaporation qui changerait la composition isotopique de l'échantillon.

La description qui suit fait référence aux procédures généralement utilisées pour la combustion des échantillons d'éthanol au moyen des systèmes automatisés de combustion commerciaux. Toute autre méthode, assurant que l'échantillon d'éthanol est quantitativement converti en dioxyde de carbone

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

sans aucune perte par évaporation d'éthanol peut convenir pour la préparation du dioxyde de carbone pour l'analyse isotopique.

Procédure expérimentale fondée sur l'utilisation d'un analyseur élémentaire :

a) Mise en capsule des échantillons :

- utiliser des capsules, une pince et un plateau de préparation propres
- prendre une capsule de la dimension appropriée à l'aide de la pince
- introduire le volume nécessaire de liquide dans la capsule à l'aide de la micropipette

Note: 3,84 mg d'éthanol absolu ou 4,17 mg de distillat ayant un titre alcoolique de 92% m/m sont nécessaires pour obtenir 2 mg de carbone. La quantité appropriée de distillat doit être calculée de la même manière selon la quantité de carbone nécessaire en fonction de la sensibilité de l'instrumentation de spectrométrie de masse.

- refermer la capsule à l'aide des pinces.
- chaque capsule doit être fermée de façon absolument étanche. En cas contraire, elle doit être rejetée et une nouvelle capsule doit être repréparée.
- pour chaque échantillon, préparer deux capsules.
- placer les capsules à l'endroit approprié sur le plateau du passeur automatique d'échantillon de l'analyseur élémentaire. Chaque capsule doit être soigneusement identifiée par un numéro d'ordre.
- placer systématiquement des capsules contenant les références de travail au début et à la fin de la série d'échantillons.
- insérer régulièrement des échantillons de contrôle dans la série d'échantillons.

b) Contrôle et ajustement de l'instrumentation d'analyse élémentaire et de spectrométrie de masse

- ajuster la température des fours de l'analyseur élémentaire et les flux de gaz d'hélium et d'oxygène pour une combustion optimale de l'échantillon.
- vérifier l'absence de fuite dans le système d'analyse élémentaire et de spectrométrie de masse (par exemple en contrôlant le courant ionique pour $m/z = 28$ correspondant à N_2).
- ajuster le spectromètre de masse pour mesurer les intensités des courants ioniques pour $m/z = 44, 45$ et 46 .
- vérifier le système à l'aide d'échantillons de contrôle connus avant de commencer les mesures sur les échantillons.

c) Déroulement d'une série de mesures

Les échantillons placés sur le passeur automatique d'échantillons de l'analyseur élémentaire (ou du chromatographe) sont introduits successivement. Le dioxyde de carbone de chaque combustion d'échantillon est élué vers le spectromètre de masse qui mesure les courants ioniques. L'ordinateur interfacé à l'instrumentation enregistre les intensités des courants ioniques et calcule les valeurs δ pour chaque échantillon (9).

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

9. CALCUL

L'objectif de la méthode est de mesurer le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol extrait à partir de la boisson spiritueuse. Le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ peut être exprimé par sa déviation par rapport à une référence de travail. La déviation isotopique carbone 13 ($\delta^{13}\text{C}$) est alors calculée sur une échelle delta pour mille par comparaison des résultats obtenus pour l'échantillon à mesurer contre ceux de la référence de travail précédemment calibrée par rapport à la référence primaire internationale (V-PDB). Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont exprimées par rapport à la référence de travail selon :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} \text{‰} = 1000 \times (\text{R}_{\text{ech}} - \text{R}_{\text{ref}}) / \text{R}_{\text{ref}}$$

où R_{ech} et R_{ref} sont respectivement les rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'échantillon et ceux de la référence de travail.

Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont alors exprimées par rapport au V-PDB selon :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/V-PDB}} \text{‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}) / 1000$$

où $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}$ est la déviation isotopique préalablement déterminée pour la référence de travail contre le V-PDB.

Pendant la mesure en ligne des petites dérives dues à la variation, des conditions instrumentales peuvent être observées. Dans ce cas, les $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons doivent être corrigés en fonction de la différence de la valeur $\delta^{13}\text{C}$ de la référence de travail et sa valeur vraie, précédemment calibrée contre le V-PDB par comparaison avec l'un des matériaux de référence international. Entre deux mesures de la référence de travail, la dérive et donc la correction à appliquer aux résultats des échantillons peuvent être assumées linéaires. La référence de travail doit être mesurée en début et en fin de toute série d'échantillons. Une correction peut ensuite être calculée pour chaque échantillon au moyen d'une interpolation linéaire entre les deux valeurs des différences entre la valeur assignée à la référence de travail et les mesures de valeurs obtenues.

10. ASSURANCE QUALITE ET CONTROLE

Contrôler que la valeur ^{13}C pour la référence de travail ne diffère pas de plus de 0,5‰ de la valeur admise. En cas contraire, les réglages de l'instrumentation du spectromètre devront être contrôlés et éventuellement réajustés.

Pour chaque échantillon, vérifier que la différence de résultat entre les deux capsules mesurées successivement est inférieure à 0,3 ‰. Le résultat final pour un échantillon donné est alors la valeur moyenne des deux capsules. Si la déviation est plus élevée que 0,3‰, la mesure doit être répétée.

Un contrôle du fonctionnement correct de la mesure peut être fondé sur l'intensité du courant ionique pour $m/z = 44$ qui est proportionnel à la quantité de carbone injectée dans l'analyseur élémentaire. Dans les conditions type, l'intensité de ce courant ionique devrait être pratiquement constante pour les échantillons en analyse. Une déviation significative doit conduire à soupçonner une évaporation d'éthanol (par exemple une capsule imparfaitement scellée) ou bien une instabilité de l'analyseur élémentaire ou du spectromètre de masse.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

11. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE LA METHODE (Précision)

Une première analyse collaborative (11.1) a été réalisée sur des distillats comportant des alcools d'origine vinique, et des alcools de canne et de betterave ainsi que différents mélanges de ces trois origines. Cette étude n'ayant pas pris en compte l'étape de distillation, des informations complémentaires provenant d'autres essais interlaboratoires réalisés sur des vins (11.2) et notamment des circuits de tests d'aptitudes (11.3) pour les mesures isotopiques ont également été considérées. Les résultats démontrent que les différents systèmes de distillation utilisés dans des conditions satisfaisantes, et en particulier ceux applicables pour les mesures RMN-FINS, n'apportent pas de variabilité significative pour les déterminations $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol du vin, et il est raisonnable de supposer qu'il en sera de même pour l'éthanol des boissons spiritueuses. Les paramètres de fidélité observés pour les vins sont quasiment identiques à ceux obtenus lors de l'étude collaborative (11.1) sur les distillats.

11.1. Étude collaborative sur les distillats

Année de l'essai interlaboratoires : 1996
Nombre de laboratoires : 20
Nombre d'échantillons : 6 échantillons en double aveugle
Analyte : $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol

Code des échantillons	Alcool d'origine vinique	Alcool de betterave	Alcool de canne
A & G	80%	10%	10%
B & C	90%	10%	0%
D & F	0%	100%	0%
E & I	90%	0%	10%
H & K	100%	0%	0%
J & L	0%	0%	100%

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Échantillons	A / G	B / C	D / F	E / I	H / K	J / L
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	19	18	17	19	19	19
Nombre de résultats acceptés	38	36	34	38	38	38
Valeur moyenne ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 25,32	- 26,75	- 27,79	- 25,26	- 26,63	- 12,54
S_r^2	0,006 4	0,007 7	0,003 1	0,012 7	0,006 9	0,004 1
Écart-type de répétabilité (S_r) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Limite de répétabilité r ($2,8 \times S_r$) ‰	0,22	0,25	0,16	0,32	0,23	0,18
S_R^2	0,038 9	0,030 9	0,038 2	0,045 9	0,031 6	0,058 4
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Limite de reproductibilité R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

11.2. Etude interlaboratoires sur deux vins et un alcool

Année de l'essai interlaboratoires : 1996

Nombre de laboratoires : 14 pour la distillation des vins dont 7 pour également la mesure $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol des vins

8 pour la mesure $\delta^{13}\text{C}$ de l'échantillon d'alcool

Nombre d'échantillons 3 (Vin blanc TAV 9,3% vol., Vin blanc de TAV 9,6% vol. et Alcool de titre alcoométrique 93% m/m)

Analyte : $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol

Échantillons	Vin rouge	Vin blanc	Alcool
Nombre de laboratoires	7	7	8
Nombre de résultats acceptés	7	7	8
Valeur moyenne ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	-26,20	-26,20	-25,08
Variance de reproductibilité S_R^2	0,0525	0,0740	0,0962
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Limite de reproductibilité R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,64	0,76	0,87

Différents systèmes de distillation ont été utilisés par les laboratoires participants. Les déterminations isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ réalisées dans un seul laboratoire sur l'ensemble des distillats retournés par les participants ne montrent ni valeur aberrante ni valeur significativement distincte des valeurs moyennes. La variance des résultats ($S^2 = 0,0059$) est comparable aux variances de répétabilité S_r^2 de l'étude collaborative sur les distillats (11.1).

11.3. Résultats des exercices des circuits d'aptitude aux essais isotopiques

Depuis décembre 1994 des exercices d'aptitude internationaux pour les déterminations isotopiques sur les vins et alcools (distillats de TAV 96% vol.) sont organisés régulièrement. Les résultats permettent aux laboratoires participants de contrôler la qualité de leurs analyses. L'exploitation statistique des résultats permet d'apprécier la variabilité des déterminations dans des conditions de reproductibilité et donc d'estimer les paramètres de variance et de limite de reproductibilité. Les résultats obtenus pour les déterminations $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol des vins et distillats sont résumés dans le tableau suivant :

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Date	Vins				Distillats			
	N	S _R	S ² _R	R	N	S _R	S ² _R	R
Déc. 1994	6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
Juin 1995	8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
Déc. 1995	7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
Mars 1996	9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
Juin 1996	8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
Sep. 1996	10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
Déc. 1996	10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
Mars 1997	10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
Juin 1997	11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49
Sep 1997	12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
Déc. 1997	11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
Mars 1998	12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
Juin 1998	12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
Sep 1998	11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
Moyenne pondérée		0,215	0,046	0,60		0,209	0,044	0,59

N : nombre de laboratoires participants

12. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Détermination par RMN de la distribution de deutérium dans l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole

OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

Détermination par spectrométrie de masse isotopique du rapport d'isotopes ¹³C/ ¹²C de l'éthanol du vin ou de celui obtenu par fermentation des moûts, des moûts concentrés ou du sucre de raisin

OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

Détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés, du sucre de raisin et des vins par l'application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS/SNIF-NMR)

OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

E.C. Regulation. Community analytical methods which can be applied in the wine sector, N°.2676/90. Detecting enrichment of grape musts, concentrated grape musts, rectified concentrated grape musts and wines by application of nuclear magnetic resonance of deuterium (SNIF-NMR)

Official Journal of the European Communities, N°L 272, Vol 33, 64-73, 3 October 1990.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Interlaboratory study about the determination of $\delta^{13}\text{C}$ in wine ethanols

OIV FV N° 1051

Fidélité de la détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol du vin

OIV FV N° 1116.

Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. A Rossmann ; H.-L. Schmidt ; F. Reniero ; G. Versini ; I. Moussa ; M.-H. Merle.

z. Lebensm. Unters. Forsch., 1996, 203, p 293-301.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

Détermination de la distribution de deutérium dans l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole par application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS/SNIF-NMR¹)

Méthode de type I
Année : 2009

1 Définition

Les atomes de deutérium contenus dans les sucres et dans l'eau d'un moût de raisin vont être redistribués après fermentation dans les molécules I, II, III et IV du vin:



L'addition de sucres exogènes (chaptalisation) avant la fermentation du moût se répercutera sur la redistribution du deutérium.

Par comparaison avec les valeurs des paramètres relatifs à un vin témoin naturel de la même région, l'enrichissement avec un sucre exogène se traduira par les variations suivantes:

Paramètres	(D/H) _I	(D/H) _{II}	(D/H) _W ^Q	R
Vin naturel	→	→	→	→
Vin enrichi:				
- sucre de betterave	↘	↗	↗	↗
- sucre de canne	} ↗	↗	↗	↘
- sucre de maïs.....				

(D/H)_I : rapport isotopique associé à la molécule I.

(D/H)_{II} : rapport isotopique associé à la molécule II

(D/H)_W^Q : rapport isotopique de l'eau du vin.

$R = 2 (D/H)_{II} / (D/H)_I$, exprime la distribution relative du deutérium dans les molécules I et II; R est directement mesuré à partir des intensités h des signaux et alors $R = 3h_{II} / h_I$.

(D/H)_I caractérise principalement l'espèce végétale qui a synthétisé le sucre et dans une mesure moindre la géographie du lieu de récolte (nature de l'eau utilisée au cours de la photosynthèse).

(D/H)_{II} représente la climatologie du lieu de production des raisins (nature de l'eau de pluie et conditions météorologiques) et dans une mesure moindre, la concentration en sucre du moût initial.

(D/H)_W^Q représente la climatologie du lieu de production et la richesse en sucre du moût initial. Par la suite ce paramètre ne sera plus considéré, car il n'est plus caractéristique de l'eau d'une boisson spiritueuse.

¹ Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire (Site-Specific Natural Isotope Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance). - Brevet: France, 81-22710; Europe, 82-402-209-9; Etats-Unis, 85-4-550-082; Japon 57-123-249.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

2 Principe

La détermination des paramètres définis ci-dessus R, (D/H)_I et (D/H)_{II}, est effectuée par RMN du deutérium sur l'éthanol extrait de la boisson spiritueuse; elle est éventuellement complétée par la détermination du rapport isotopique ¹³C/¹²C de l'éthanol.

3 Préparation de l'échantillon pour l'analyse

Remarque: Tout dispositif d'extraction de l'éthanol peut être utilisé à la condition qu'il permette de récupérer entre 98 et 98,5 % de l'alcool du vin en un distillat qui titre entre 92 et 93 % mas. (95 % vol.)

3.1 Extraction de l'éthanol

3.1.1 Appareillage et réactifs

- Dispositif pour extraction de l'éthanol (fig. 1) comportant :

- Chauffe-ballon électrique avec régulateur de tension;
- Ballon à rodage de 1 litre,
- Colonne Cadiot à bande tournante (mobile en téflon),
- Fioles coniques à rodage de 125 ml,
- Flacons à bouchon plastique de 125 et 60 ml.

- Réactifs pour le dosage de l'eau selon la technique de Karl Fischer.

3.1.2. Mode opératoire

3.1.2.1. Extraction de l'éthanol

Introduire une prise d'essai homogène de 50 à 300 ml (selon son titre alcoométrique) de boisson spiritueuse dans le ballon de l'appareil à distiller avec un taux de reflux constant voisin de 0,9. Mettre en place une fiole conique rodée de 125 ml préalablement tarée, pour recevoir le distillat. Recueillir le liquide bouillant entre 78,0 et 78,2° C, soit environ 40 à 60 ml. Quand la température dépasse 78,5° C, arrêter le prélèvement pendant 5 minutes.

Quand la température est revenue à 78° C, prélever à nouveau le distillat jusqu'à 78,5° C et répéter cette opération jusqu'à ce que la température après arrêt du prélèvement et fonctionnement en circuit fermé ne redescende plus.

La distillation complète dure environ 5 heures. Cette façon de procéder permet de récupérer entre 98 et 98,5 % de l'alcool total la boisson spiritueuse en un distillat qui titre entre 92 et 93 % mas. (95 % vol.), titre pour lequel les conditions RMN décrites au paragraphe 4 ont été établies.

L'éthanol récupéré est pesé.

3.1.2.2. Détermination du titre alcoométrique de l'alcool extrait

Sur une prise d'essai voisine de 0,5 ml d'alcool, de masse *p* exactement connue, la teneur en eau est déterminée par la méthode de Karl Fischer, soit ρ 'g .

Le titre massique de l'éthanol est donné par :

$$t_m^D = \frac{\rho - \rho'}{\rho} \times 100$$

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

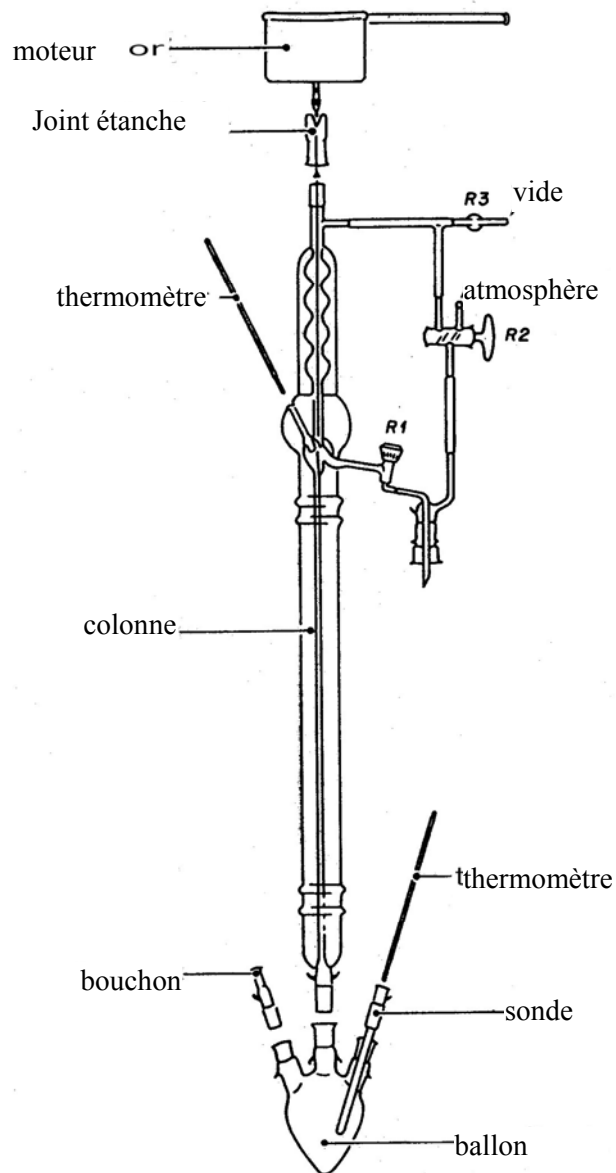


Figure 1 – Dispositif pour extraction de l'éthanol

3.2. Préparation de l'échantillon d'alcool pour la mesure RMN

3.2.1. Réactifs

N,N-tétraméthylurée (TMU); utiliser un échantillon de TMU de référence de rapport isotopique D/H donné et contrôlé. Cet échantillon est fourni par le Bureau communautaire de Référence, à Bruxelles.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

3.2.2. Mode opératoire

- Sonde RMN de 15 mm de diamètre:

Dans un flacon préalablement taré, prélever 7 ml d'alcool obtenu en 3.1.2 et le peser à 0,1 mg près, soit m_A ; prélever ensuite 3 ml du standard interne (TMU) et peser à 0,1 mg près, soit m_{st} . Homogénéiser le mélange par agitation.

- Sonde RMN de 10 mm de diamètre:

3,2 ml d'alcool et 1,3 ml de TMU suffisent.

Selon les types de spectromètre et de sonde utilisés (cf. paragraphe 4), ajouter une quantité suffisante d'hexafluorobenzène comme substance de stabilisation champ-fréquence (lock).

Spectromètre	Sonde	
	10 mm	15 mm
7,05 T	150 μ l	200 μ l
9,4 T	35 μ l	50 μ l

4. Enregistrement des spectres RMN ^2H de l'alcool.

Détermination des paramètres isotopiques.

4.1. Matériel

- Spectromètre RMN muni d'une sonde spécifique «deutérium» accordée à la fréquence ν_0 caractéristique, du champ B_0 (par exemple, pour $B_0 = 7,05$ T, $\nu_0 = 46,05$ MHz et pour $B_0 = 9,4$ T, $\nu_0 = 61,4$ MHz), possédant un canal de découplage du proton B_2 et un canal de stabilisation champ-fréquence (lock) à la fréquence du fluor.

La résolution, mesurée sur le spectre, transformé sans multiplication exponentielle (c'est-à-dire $LB = 0$, fig. 2b) et exprimée par la largeur à mi-hauteur des signaux méthyle et méthylène de l'éthanol et du signal méthyle du TMU, doit être inférieure à 0,5 Hz.

La sensibilité mesurée avec un facteur de multiplication exponentielle LB égal à 2 (fig. 2a) doit être supérieure ou égale à 150 pour le signal méthyle de l'éthanol titrant 95% vol. (93,5% mas.)

Dans ces conditions, l'intervalle de confiance sur la mesure de la hauteur du signal, calculé pour une probabilité de 97,5% (test à 1 aile) et 10 répétitions du spectre, est de 0,35 %.

- Changeur automatique d'échantillons (éventuellement).
- Logiciel de traitement des données.
- Tubes échantillons de 15 mm ou de 10 mm selon les performances du spectromètre.

4.2. Réglages du spectromètre et vérifications

4.2.1. Réglages

Procéder aux réglages habituels d'homogénéité et de sensibilité selon les indications du constructeur.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

4.2.2. Vérification de la validité des réglages

Utiliser des éthanols de référence, désignés par les lettres C (éthanol de canne à sucre), V (éthanol de vin) et B (éthanol de betterave), présentant une teneur isotopique différente mais étalonnés avec précision. Ces échantillons sont fournis par le Bureau Communautaire de Référence à Bruxelles.

En suivant le mode opératoire décrit en 4.3, déterminer les valeurs isotopiques de ces alcools désignés en notant en indice supérieur C_{mes} , V_{mes} , B_{mes} (voir 5.3).

Les comparer aux valeurs de référence correspondantes, désignées en notant en indice supérieur C_{st} , B_{st} , V_{st} (voir 5.3).

L'écart-type de répétabilité obtenu sur la moyenne de 10 répétitions de chaque spectre doit être inférieur à 0,01 sur le rapport R et inférieur à 0,3 ppm sur $(D/H)_I$ et sur $(D/H)_{II}$.

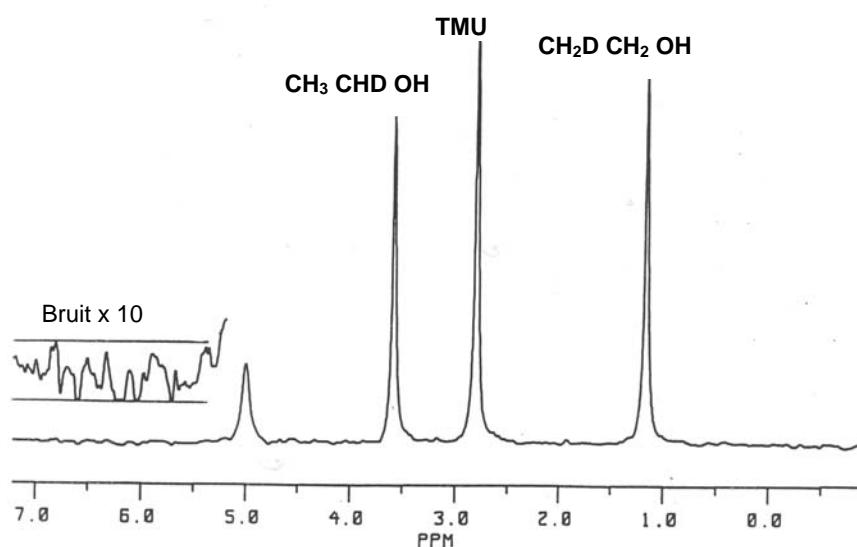


Figure 2a
Spectre RMN 2H d'un éthanol de vin avec une référence interne
(TMU : N,N-tétraméthylurée)

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

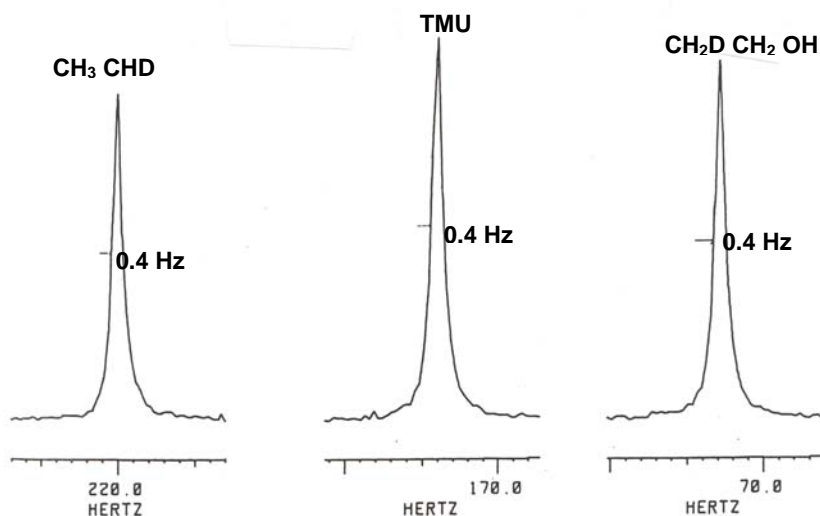


Figure 2b
Spectre ^2H de l'éthanol réalisé dans les mêmes conditions que celles de la figure 2a, mais sans multiplication exponentielle ($\text{LB} = 0$)

Les valeurs moyennes obtenues pour les différents paramètres isotopiques $[\text{R}, (\text{D}/\text{H})_{\text{I}}, (\text{D}/\text{H})_{\text{II}}]$ doivent se situer dans l'écart-type de répétabilité correspondant, donné, pour ces paramètres et pour les trois alcools de référence, par le Bureau Communautaire de Référence. Sinon reprendre les réglages.

4.3. Conditions d'acquisition des spectres RMN

Placer l'échantillon d'alcool préparé en 3.2 dans un tube de 15 ou de 10 mm et l'introduire dans la sonde.

Les conditions d'acquisition des spectres RMN sont les suivantes:

- La température de la sonde (par exemple 302 K) doit être constante ;
- Temps d'acquisition de 6,8 s au moins pour 1200 Hz de largeur spectrale (Mémoire 16 K), c'est-à-dire environ 20 ppm à 61,4 MHz ou 27 ppm à 46,1 MHz.
- Impulsion: 90 °.
- Régler le délai à l'acquisition; sa valeur doit être du même ordre de grandeur que le temps d'échantillonnage (Dwell time).
- Détection en quadrature: fixer l'«offset» 01 entre les signaux - OD et - CHD pour l'éthanol et entre les signaux HOD et TMU pour l'eau.
- Déterminer la valeur de l'offset de découplage 02 à partir du spectre protonique mesuré par la bobine de découplage sur le même tube. Un bon découplage est

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

obtenu quand 02 est situé au milieu de l'intervalle de fréquence existant entre les groupes CH₃- et CH₂- .

Utiliser le mode de découplage par large bande.

Effectuer pour chaque spectre, un nombre d'accumulations NS suffisant pour obtenir le rapport signal-sur-bruit donné en paragraphe 4.1 et répéter NE = 10 fois cette série de NS accumulations. Les valeurs de NS dépendent des types de spectromètre et de sonde utilisés (cf. 4) et on choisira par exemple:

Spectromètre	Sonde	
	10 mm	15 mm
7,05 T	NS = 304	NS = 200
9,4 T	NS = 200	NS = 128

5. Expression des résultats

5.1. Pour chacun des 10 spectres (voir spectre RMN de l'éthanol, figure 2a), déterminer:

$$R = 3 \frac{h_{II}}{h_I} = 3 \times \frac{\text{hauteur du signal II (CH}_3\text{ CHD OH)}}{\text{hauteur du signal I (CH}_2\text{D CH}_2\text{OH)}}$$

$$(D/H)_I = 1,5866 \cdot T_I \cdot \frac{m_{st}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{st}}{t_m^D}$$

$$(D/H)_{II} = 2,3799 \cdot T_{II} \cdot \frac{m_{st}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{st}}{t_m^D}$$

avec

- $T_I = \frac{\text{hauteur du signal I (CH}_2\text{D CH}_2\text{OH)}}{\text{hauteur du signal du standard interne (TMU)}}$
- $T_{II} = \frac{\text{hauteur du signal II (CH}_3\text{CHD OH)}}{\text{hauteur du signal du standard interne (TMU)}}$
- m_{st} et m_A , voir 3.3.2.
- t_m^D , voir 3.1.2.2.
- $(D/H)_{st}$ = rapport isotopique du standard interne (TMU) indiqué sur le flacon fourni par le Bureau Communautaire de Référence

L'utilisation des hauteurs de signaux au lieu des surfaces, mesurables avec moins de précision, suppose des largeurs de raies à mi-hauteurs égales, ce qui est une approximation raisonnable (fig. 2b).

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

5.2. Pour chacun des paramètres isotopiques, calculer la moyenne des 10 déterminations et l'intervalle de confiance.

Un logiciel optionnel (par exemple SNIF-NMR) adaptable sur le calculateur du spectromètre permet d'effectuer ces calculs en ligne.

Remarque: Si, après le réglage du spectromètre, il y a un écart systématique entre les valeurs moyennes obtenues pour les caractéristiques isotopiques des alcools de référence (4.2.2) et les valeurs indiquées par le Bureau Communautaire de Référence, à l'écart-type près, on pourra appliquer la correction suivante pour retrouver la vraie valeur d'un échantillon X quelconque.

L'interpolation sera effectuée en prenant les valeurs des échantillons de référence qui encadrent celle de l'échantillon X.

Soit $(D/H)_I^{Xmes}$ la valeur mesurée et $(D/H)_I^{Xcorr}$ la valeur corrigée, on a:

$$(D/H)_I^{Xcorr} = (D/H)_I^{Bst} + \alpha [(D/H)_I^{Xmes} - (D/H)_I^{Bmes}]$$

$$\text{avec } \alpha = \frac{(D/H)_I^{Yst} - (D/H)_I^{Bst}}{(D/H)_I^{Ymes} - (D/H)_I^{Bmes}}$$

Exemple:

Échantillons de référence fournis et étalonnés par le Bureau Communautaire de Référence:

$$(D/H)_I^{Yst} = 102,0 \text{ ppm} \quad (D/H)_I^{Bst} = 91,95 \text{ ppm}$$

Échantillons de référence mesurés par le laboratoire:

$$(D/H)_I^{Ymes} = 102,8 \text{ ppm} \quad (D/H)_I^{Bmes} = 93,0 \text{ ppm}$$

Échantillon examiné non corrigé:

$$(D/H)_I^{Xmes} = 100,2 \text{ ppm}$$

On calcule : $\alpha = 1,0255$ et $(D/H)_I^{Xcorr} = 99,3 \text{ ppm}$

BIBLIOGRAPHIE

- MARTIN G.J., MARTIN M.L., MABON F., *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 2380-2382.
MARTIN G.J., MARTIN M.L., *J. Chim. Phys.*, 1983, **80**, 294-297.
MARTIN G.J., GUILLOU C., NAULET N., BRUN S., Tep Y., Cabanis J.C.,
CABANIS M.T., SUDRAUD P., *Sci. Alim.*, 1986, **6**, 385-405.
MARTIN G.J., ZHANG B.L., NAULET N. and MARTIN M.L., *J. Amer. Chem. Soc.*,
1986, **108**, 5116-5122.
MARTIN G.J., GUILLOU C., MARTIN M.L., CABANIS M.T., Tep Y. et Aerny J., *J. Agric. Food Chem.*, 1988, **36**, 316.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI



RÉSOLUTION OIV/OENO 382A/2009

ACTUALISATION DU RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLES – PARTIE 4

L'ASSEMBLEE GENERALE

VU l'article 2 paragraphe 2b iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'organisation internationale de la vigne et du vin,

VU les actions du plan stratégique de l'OIV 2009-2012 en particulier celle qui vise à réorganiser les publications relatives aux méthodes d'analyse vitivinicoles

CONSIDERANT les travaux de la sous-commission des méthodes d'analyse

VU l'édition de 1994 du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons

Vu que certaines méthodes publiées dans le Recueil actuel s'appliquent effectivement aux boissons d'origine vitivinicole

DECIDE d'introduire ces méthodes dans le « Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicoles »

DECIDE, de retenir en tant que méthodes de type IV certaines méthodes figurant déjà dans le Recueil actuel et de décrire comme méthodes d'analyse de Type II, la méthode suivante ;
Dosage des principaux composés extraits du bois lors du vieillissement des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Partie 1 : Méthodes de type IV retenues qui figurent dans l'édition 1994 du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons. – Pour Information seulement

<i>Titre de la Méthode</i>	<i>N° page du Recueil édition 1994</i>
<i>Masse volumique</i>	<i>47</i>
<i>TAV par spectroscopie dans le proche infrarouge</i>	<i>66</i>
<i>Extrait sec indirect par calcul</i>	<i>85</i>
<i>pH</i>	<i>113</i>
<i>Carbamate d'éthyle</i>	<i>154</i>
<i>Intensité colorante</i>	<i>159</i>
<i>Caractéristiques chromatiques</i>	<i>161</i>
<i>Turbidité</i>	<i>178</i>
<i>Calcium</i>	<i>186</i>
<i>Cuivre</i>	<i>188</i>
<i>Fer</i>	<i>190</i>
<i>Plomb</i>	<i>192</i>
<i>Propanol-2 par CPG</i>	<i>293</i>
<i>Absorbance UV des alcools rectifiés d'origine vitivinicoles</i>	<i>306</i>
<i>Détermination de la teneur en carbone 14 par spectrométrie à scintillation liquide</i>	<i>307</i>

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Partie 2 : Nouvelle méthode proposée

DOSAGE DES PRINCIPAUX COMPOSES EXTRAITS DU BOIS LORS DU VIEILLISSEMENT DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE

Méthode de type II

Année : 2009

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION.

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

2. PRINCIPE.

Dosage par chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.), avec détection par spectrophotométrie ultra-violette à plusieurs longueurs d'ondes et par spectrofluorimétrie.

3. REACTIFS.

Les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente. Il est souhaitable d'utiliser de l'eau microfiltrée dont la résistivité est de 18.2 MΩ.

3.1 Alcool à 96 % vol.

3.2 Méthanol qualité C.L.H.P. (Solvant B).

3.3 Acide acétique dilué à 0,5 % vol. (Solvant A).

3.4 Phases mobiles : (à titre d'exemple seulement).

Solvants A (acide acétique à 0,5 %) et solvant B (Méthanol pur) Filtrer sur membrane (porosité 0,45 µm). Dégazer en cuve à ultrasons si nécessaire.

3.5 Etalons de référence à 99 % de pureté minimale : Furfural, hydroxy-5 méthyl furfural, méthyl-5 furfural, vanilline, syringaldéhyde, coniféraldéhyde, sinapaldéhyde, acides gallique et ellagique, acides vanillique et syringique, et scopolétine.

3.6 Solution de référence : les substances étalons sont dissoutes dans une solution hydroalcoolique à 50 % vol. Les concentrations finales dans la solution de référence sont

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

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

4. APPAREILLAGE.

Matériel courant de laboratoire,

4.1 Un chromatographe en phase liquide haute performance pouvant fonctionner en gradient binaire et équipé de :

4.1.1 Un détecteur spectrophotométrique permettant la mesure à une longueur d'onde à 280 et 313 nm. Il est toutefois préférable de travailler avec un détecteur à longueurs d'ondes multiples par exemple à barrettes de diodes, pour pouvoir confirmer la pureté des pics.

4.1.2 Un détecteur par spectrofluorimétrie longueur d'onde d'excitation 354 nm, longueur d'onde d'émission : 446 nm (pour le dosage fin de la scopolétine ; mais cette dernière est aussi détectable à 313 nm en spectrophotométrie).

4.1.3 Un dispositif d'injection permettant d'introduire une prise d'essai de 10 ou 20 µl. (par exemple).

4.1.4 Une colonne pour chromatographie liquide haute performance du type RP C18, de granulométrie 5 µm au maximum.

4.2 Seringues pour C.L.H.P.

4.3 Dispositif de filtration de petits volumes sur membrane.

4.4 Intégrateur-calculateur ou enregistreur dont les performances sont compatibles avec l'ensemble de l'appareillage, en particulier il doit avoir plusieurs canaux d'acquisition.

5. MODE OPERATOIRE.

5.1 Préparation de l'injection

La solution de référence de même que la boisson spiritueuse sont filtrées, si nécessaire, sur membrane dont le diamètre des pores est de 0,45 µm au maximum.

5.2 Conditions opératoires chromatographiques : Effectuer l'analyse à température ambiante dans les conditions définies en 4.1 en utilisant les phases mobiles (3.4) avec un débit d'environ 0,6 ml par minute selon le programme suivant (donné à titre d'exemple seulement)

Temps :	0 min	50 min	70 min	90 min
solvant A (eau-acide) :	100 %	60%	100%	100%
solvant B (méthanol) :	0 %	40%	0%	0%

Toutefois, dans certains cas, ce gradient doit être modifié pour éviter des co-élutions.

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

5.3 Dosage

5.3.1 Injecter les étalons de référence séparément, puis en mélange. Adapter les conditions opératoires de telle sorte que les facteurs de résolution des pics de tous les composés soient au moins égaux à 1.

5.3.2 Injecter l'échantillon tel que préparé en 5.1 après l'avoir filtré sur membrane.

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

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS.

Exprimer la concentration de chaque constituant en mg/l.

7. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE LA METHODE (PRECISION)

Les données suivantes ont été obtenues en 2009 à partir d'une étude internationale de performance de la méthode sur des boissons spiritueuses diverses, effectuée selon les procédures internationalement reconnues.

Légende des tableaux :

nLT	Nombre de laboratoires participants
nL	Nombre de laboratoires pour estimer les limites de fidélité
r	limite de répétabilité
Sr	écart type de répétabilité
RSDr	écart type de répétabilité en % du niveau
R	limite de reproductibilité
SR	écart type de reproductibilité
RSDR	écart type de reproductibilité en % du niveau
PRSDR	RSDR estimé avec l'équation d'Horwitz
HoR	HorRat = RSDR / PRSDR

7.1 Acide gallique

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	16	15	1.2	0.2	0.07	6.1	1.2	0.43	36	16	2.3
Brandy	15	14	0.4	0.1	0.04	8.1	0.6	0.20	47	18	2.6
Rhum	16	16	2.0	0.2	0.06	2.9	1.7	0.62	31	14	2.1
Cognac 1	16	16	6.1	0.5	0.18	3.0	9.1	3.3	53	12	4.4
Bourbon	16	16	7.3	0.5	0.18	2.4	6.2	2.2	30	12	2.6
Cognac 2	16	16	21.8	1.7	0.60	2.8	21.7	7.7	35	10	3.5

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

7.2 5-Hydroxyméthylfurfural

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	16	14	5.0	0.2	0.09	1.7	1.1	0.39	8	13	0.6
Brandy	16	14	11.1	0.3	0.09	0.8	2.8	1.01	9	11	0.8
Rhum	16	14	9.4	0.3	0.09	1.0	1.4	0.50	5	11	0.5
Cognac 1	16	14	33.7	1.2	0.42	1.3	12.5	4.5	13	9	1.4
Bourbon	16	14	5.8	0.2	0.07	1.2	1.1	0.4	7	12	0.6
Cognac 2	16	14	17.5	0.4	0.13	0.8	4.6	1.6	9	10	0.9

7.3 Furfural

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	15	14	2.9	0.1	0.04	1.4	0.7	0.24	8	14	0.6
Brandy	15	12	1.2	0.2	0.05	4.5	0.5	0.18	15	16	0.9
Rhum	15	13	1.7	0.1	0.04	2.3	0.3	0.09	5	15	0.4
Cognac 1	15	14	10.6	0.5	0.18	1.7	3.8	1.4	13	11	1.1
Bourbon	15	13	15.3	0.6	0.23	1.5	1.4	0.49	3	11	0.3
Cognac 2	15	13	13.9	0.6	0.20	1.5	1.9	0.69	5	11	0.5

7.4 Acide vanillique

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	15	12	0.2	0.1	0.03	14.2	0.2	0.06	28	20	1.4
Brandy	15	11	0.2	0.1	0.04	16.5	0.1	0.05	20	20	1.0
Rhum	15	14	1.5	0.1	0.03	2.3	1.4	0.51	35	15	2.3
Cognac 1	15	14	0.8	0.3	0.10	12.6	0.7	0.2	31	17	1.9
Bourbon	15	15	2.4	0.4	0.13	5.3	3.4	1.22	51	14	3.6
Cognac 2	15	14	2.7	0.6	0.21	7.7	2.0	0.70	26	14	1.9

7.5 5-Méthylfurfural

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	11	11	0.1	0.0	0.01	10.7	0.1	0.03	35	24	1.5
Brandy	11	11	0.2	0.0	0.01	6.1	0.1	0.04	18	20	0.9
Rhum	11	8	0.1	0.1	0.02	13.6	0.1	0.03	22	22	1.0
Cognac 1	11	11	0.5	0.1	0.02	4.7	0.5	0.18	39	18	2.2
Bourbon	11	10	1.7	0.1	0.03	2.0	0.6	0.20	12	15	0.8
Cognac 2	11	11	0.8	0.2	0.07	10.0	0.7	0.26	35	17	2.1

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

7.6 Acide syringique

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	16	16	0.4	0.1	0.03	6.7	0.2	0.08	19	18	1.0
Brandy	15	15	0.2	0.1	0.02	12.6	0.1	0.05	29	21	1.4
Rhum	16	15	2.5	0.2	0.06	2.3	0.8	0.29	11	14	0.8
Cognac 1	16	15	1.4	0.4	0.13	9.0	0.7	0.26	18	15	1.2
Bourbon	16	16	3.4	0.2	0.08	2.3	1.2	0.43	13	13	0.9
Cognac 2	16	15	4.8	0.3	0.11	2.3	1.9	0.67	14	13	1.1

7.7 Vanilline

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	16	16	0.5	0.1	0.03	6.8	0.3	0.09	19	18	1.1
Brandy	15	15	0.2	0.1	0.02	9.6	0.2	0.06	25	20	1.2
Rhum	16	16	1.2	0.2	0.06	4.6	0.5	0.18	15	16	1.0
Cognac 1	16	16	1.2	0.3	0.11	8.9	0.8	0.27	22	16	1.4
Bourbon	16	16	3.2	0.3	0.11	3.5	1.2	0.41	13	13	0.9
Cognac 2	16	16	3.9	0.3	0.09	2.3	1.7	0.62	16	13	1.2

7.8 Syringaldéhyde

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	16	13	1.0	0.1	0.03	2.6	0.2	0.08	8	16	0.5
Brandy	15	13	0.2	0.1	0.02	8.1	0.2	0.07	33	20	1.6
Rhum	16	13	4.8	0.1	0.04	0.8	0.7	0.23	5	13	0.4
Cognac 1	16	12	3.2	0.2	0.08	2.6	0.5	0.19	6	14	0.4
Bourbon	16	14	10.5	0.3	0.10	0.9	1.1	0.39	4	11	0.3
Cognac 2	16	13	9.7	0.3	0.09	0.9	1.2	0.43	4	11	0.4

7.9 Scopolétine

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	10	9	0.09	0.007	0.0024	2.6	0.04	0.01	15	23	0.6
Brandy	10	8	0.04	0.002	0.0008	2.2	0.02	0.01	16	26	0.6
Rhum	10	9	0.11	0.005	0.0018	1.6	0.07	0.03	23	22	1.0
Cognac 1	10	8	0.04	0.004	0.0014	3.3	0.02	0.01	17	26	0.7
Bourbon	10	8	0.65	0.015	0.0054	0.8	0.26	0.09	15	17	0.8
Cognac 2	10	8	0.15	0.011	0.0040	2.7	0.06	0.02	15	21	0.7

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI

7.10 Coniféraldéhyde

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	13	12	0.2	0.04	0.02	9.2	0.1	0.04	23	21	1.1
Brandy	12	12	0.2	0.04	0.02	9.8	0.1	0.04	27	21	1.3
Rhum	13	13	0.6	0.07	0.03	4.6	0.3	0.11	21	18	1.2
Cognac 1	12	12	0.8	0.09	0.03	4.3	0.5	0.18	23	17	1.4
Bourbon	13	13	4.6	0.24	0.09	1.9	1.1	0.38	8	13	0.6
Cognac 2	13	13	1.3	0.16	0.06	4.5	0.7	0.25	19	15	1.2

7.11 Sinapaldéhyde

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	14	14	0.3	0.06	0.02	7.5	0.2	0.09	31	19	1.6
Brandy	14	13	0.2	0.03	0.01	4.6	0.2	0.05	27	20	1.3
Rhum	14	12	0.2	0.06	0.02	11.2	0.2	0.08	46	21	2.2
Cognac 1	14	13	1.6	0.17	0.06	3.7	0.6	0.20	13	15	0.8
Bourbon	15	13	8.3	0.38	0.14	1.6	2.3	0.81	10	12	0.8
Cognac 2	14	12	0.3	0.08	0.03	11.4	0.5	0.18	73	20	3.7

7.12 Acide ellagique

	nLT	nL	Mean (mg/L)	r (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	R (mg/L)	SR (mg/L)	RSDR (%)	PRSDR (%)	HoR
Whisky	7	7	3.2	0.6	0.20	6.3	4.0	1.41	44	13	3.2
Brandy	7	7	1.0	0.4	0.16	16	1.2	0.42	43	16	2.7
Rhum	7	7	9.5	0.9	0.30	3.2	11	4.0	42	11	3.7
Cognac 1	7	7	13	1.1	0.41	3.2	14	5.0	39	11	3.6
Bourbon	7	7	13	2.7	0.95	7.4	14	4.9	39	11	3.5
Cognac 2	7	6	36	1.0	0.34	1.0	40	14	40	9	4.3

8. BIBLIOGRAPHIE

- PUECH J.M. 1986. in Les arômes des vins (Montpellier).
- Méthodes d'analyse des boissons spiritueuses d'origine viticole, 1990, BERTRAND A., F.V. O.I.V. n° 867.
- Comparaison de trois méthodes de dosages des composés phénoliques totaux dans les spiritueux, 1992, VIDAL J-P., CANTAGREL R., FAURE A., BOULESTEIX J-M., F.V. O.I.V. n° 904.
- FV 1323 (2009) - Validation de l'analyse par HPLC des composés issus de la maturation sous bois des spiritueux

*Exemplaire certifié conforme
Zagreb, le 3 juillet 2009
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

Federico CASTELLUCCI