

## II

(Actos no legislativos)

## REGLAMENTOS

## REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2016/635 DE LA COMISIÓN

de 22 de abril de 2016

**por el que se modifica el anexo del Reglamento (CE) n.º 2870/2000 en lo que atañe a determinados métodos de referencia para el análisis de las bebidas espirituosas**

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n.º 110/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de enero de 2008, relativo a la definición, designación, presentación, etiquetado y protección de la indicación geográfica de bebidas espirituosas y por el que se deroga el Reglamento (CEE) n.º 1576/89 del Consejo <sup>(1)</sup>, y en particular su artículo 28, apartado 2,

Considerando lo siguiente:

- (1) En el Reglamento (CE) n.º 2870/2000 de la Comisión <sup>(2)</sup> se enumeran y describen los métodos de referencia para el análisis de las bebidas espirituosas. Sin embargo, aún no se han descrito algunos métodos enumerados en el anexo de dicho Reglamento, entre los que figuran los métodos para la determinación de la acidez volátil y los azúcares totales en las bebidas espirituosas.
- (2) Los métodos para la determinación de la acidez volátil y los azúcares totales en determinadas bebidas espirituosas han sido sometidos a dos estudios de validación internacionales que fueron realizados de acuerdo con procedimientos reconocidos internacionalmente y sus parámetros de rendimiento del método han sido considerados aceptables. Los estudios fueron llevados a cabo como parte de un proyecto de investigación en el marco del programa «Normas mediciones y ensayos» (NME) del cuarto programa marco de la Comisión Europea (CE). Procede, por tanto, incluir la descripción de estos métodos en el anexo del Reglamento (CE) n.º 2870/2000.
- (3) El Reglamento (CE) n.º 110/2008 establece requisitos para algunas categorías de bebidas espirituosas que deben envejecer en toneles de madera y prevé que otras categorías pueden someterse a dicho envejecimiento. El análisis de los principales compuestos procedentes de la madera puede ser útil a la hora de determinar si una muestra es coherente con la definición correspondiente a la categoría pertinente de bebida espirituosa. En su Resolución OIV/OENO 382A/2009, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) ha reconocido un método de análisis para la determinación de estos compuestos. El reconocimiento del método se basó en los datos obtenidos a partir de un estudio internacional de rendimiento del método sobre diferentes bebidas espirituosas, efectuado según los procedimientos internacionalmente reconocidos. Por lo tanto, este método y su descripción deben añadirse a los métodos de referencia de la Unión para el análisis de las bebidas espirituosas que figuran en el anexo del Reglamento (CE) n.º 2870/2000.
- (4) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CE) n.º 2870/2000 en consecuencia.
- (5) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de Bebidas Espirituosas.

<sup>(1)</sup> DO L 39 de 13.2.2008, p. 16.

<sup>(2)</sup> Reglamento (CE) n.º 2870/2000 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2000, que establece métodos comunitarios de referencia para el análisis de las bebidas espirituosas (DO L 333 de 29.12.2000, p. 20).

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

*Artículo 1*

El anexo del Reglamento (CE) n.º 2870/2000 queda modificado con arreglo al anexo del presente Reglamento.

*Artículo 2*

El presente Reglamento entrará en vigor a los tres días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 22 de abril de 2016.

*Por la Comisión*  
*El Presidente*  
Jean-Claude JUNCKER

\_\_\_\_\_

## ANEXO

El anexo del Reglamento (CE) n.º 2870/2000 queda modificado como sigue:

1) El índice queda modificado como sigue:

- a) en los puntos III.3 y VIII, se suprime el término «(p.m.)»;
- b) se añade la letra siguiente:

«X. Determinación de los compuestos de la madera: furfural, 5-hidroxi metil furfural, 5-metil furfural, vanillina, siringaldehído, coniferaldehído, sinapaldehído, ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido siríngico y escopoletina.»

2) En el capítulo III se añade la parte siguiente:

«III.3. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ VOLÁTIL DE LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS

1. **Ámbito de aplicación**

El método ha sido validado en un estudio interlaboratorios para el ron, el brandy, el orujo y los aguardientes de frutas, en niveles que oscilan entre 30 mg/l y 641 mg/l.

2. **Referencias normativas**

ISO 3696: 1987 Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo.

3. **Definiciones**

- 3.1. La acidez volátil se calcula deduciendo la acidez fija de la acidez total.
- 3.2. La acidez total es la suma de acideces valorables.
- 3.3. La acidez fija es la acidez del residuo después de haber evaporado la bebida espirituosa a sequedad.

4. **Principio**

La acidez total y la acidez fija se determinan mediante valoración o mediante potenciometría.

5. **Reactivos y materiales**

Para el análisis, salvo indicación contraria, deben utilizarse solo reactivos de categoría analítica identificada y agua al menos de categoría 3 como se define en ISO 3696:1987.

- 5.1. Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,01 M.
- 5.2. Solución de indicador mixto:  
Pesar 0,1 g de carmín de índigo y 0,1 g de rojo de fenol.  
Disolver en 40 ml de agua y completar hasta 100 ml con etanol.

6. **Instrumental y equipo**

Instrumental indirecto de laboratorio, material de vidrio de clase A y lo siguiente:

- 6.1. Bomba de agua

- 6.2. Evaporador rotatorio o baño ultrasónico
- 6.3. Aparatos para titulación por potenciometría (opcional)

## 7. Muestras y toma de muestras

Las muestras se almacenan a temperatura ambiente antes del análisis.

## 8. Procedimiento

### 8.1. Acidez total

#### 8.1.1. Preparación de la muestra

La bebida espirituosa se irradia con ultrasonidos (ultrasonicación) o se agita dos minutos al vacío para librarla del anhídrido carbónico, si fuera necesario.

#### 8.1.2. Valoración

Introducir con una pipeta 25 ml de bebida espirituosa en un matraz Erlenmeyer de 500 ml.

Añadir aproximadamente 200 ml de agua destilada hervida y enfriada (preparada el mismo día) y de 2 a 6 gotas de la solución de indicador mixto (5.2).

Valorar con la solución de hidróxido de sodio 0,01 M (5.1) hasta que el color verde amarillento cambie a violeta en el caso de bebidas espirituosas incoloras, o el color amarillo amarronado cambie a rojo amarronado en el caso de las bebidas espirituosas de color marrón, respectivamente.

La valoración puede igualmente efectuarse por potenciometría a pH 7,5.

Sea  $n_1$  ml el volumen añadido de la solución de hidróxido de sodio 0,01 M.

#### 8.1.3. Cálculo

La acidez total (TA) expresada en miliequivalentes por litro de la bebida espirituosa es igual a  $0,4 \times n_1$ .

La acidez total (TA') expresada en mg de ácido acético por litro de la bebida espirituosa es igual a  $24 \times n_1$ .

### 8.2. Acidez fija

#### 8.2.1. Preparación de la muestra

Evaporar 25 ml de la bebida espirituosa a sequedad:

Introducir con una pipeta 25 ml de bebida espirituosa en una cápsula de evaporación cilíndrica de fondo plano de 55 mm de diámetro. Durante la primera hora de evaporación, la cápsula de evaporación se coloca sobre la tapa de un baño de agua hirviente de modo que el líquido no hierva, ya que esto podría ocasionar pérdidas por salpicaduras.

Terminar el secado colocando la cápsula de evaporación en una estufa a 105 °C durante dos horas. Dejar que la cápsula de evaporación se enfríe en un desecador.

#### 8.2.2. Valoración

Disolver el residuo de la evaporación con agua destilada hervida y refrigerada (preparada el mismo día), completar hasta un volumen aproximado de 100 ml y añadir 2-6 gotas de la solución de indicador mixto (5.2).

Valorar con la solución de hidróxido de sodio de 0,01 M (5.1).

La valoración puede igualmente efectuarse por potenciometría a pH 7,5.

Sea  $n_2$  ml el volumen añadido de la solución de hidróxido de sodio 0,01 M.

### 8.2.3. Cálculo

La acidez fija (FA) expresada en miliequivalentes por litro de bebida espirituosa es igual a  $0,4 \times n_2$ .

La acidez fija (FA) expresada en mg de ácido acético por litro de bebida espirituosa es igual a  $24 \times n_2$ .

## 9. Cálculo de la acidez volátil

### 9.1. Expresión en miliequivalentes por litro:

Es decir:

TA = acidez total en miliequivalentes por litro

FA = acidez fija en miliequivalentes por litro

La acidez volátil, VA, en miliequivalentes por litro es igual a:

$$TA - FA$$

### 9.2. Expresión en mg de ácido acético por litro:

Es decir:

TA' = acidez total en mg de ácido acético por litro

FA' = acidez fija en mg de ácido acético por litro

La acidez volátil, VA, en mg de ácido acético por litro es igual a:

$$TA' - FA'$$

### 9.3. La expresión en g de ácido acético por hl de alcohol puro al 100 % vol. es igual a: $\frac{TA' - FA'}{A} \times 10$

donde A es el grado alcoholimétrico por volumen de la bebida espirituosa.

## 10. Características de rendimiento del método (precisión)

### 10.1. Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios

Los datos siguientes han sido obtenidos a partir de un estudio internacional de rendimiento del método efectuado según los procedimientos reconocidos internacionalmente [1] [2].

**Año del estudio interlaboratorios**      **2000**

Número de laboratorios                      18

Número de muestras                            6

Muestras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratorios seleccionados tras la eliminación de los valores anómalos	16	18	18	14	18	18
Número de valores anómalos (laboratorios)	2			4		
Número de resultados aceptados	32	36	36	28	36	36
Mean value ( $\bar{x}$ ) [mg/L]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5
Desviación estándar relativa de repetibilidad, RSD <sub>r</sub> [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, RSD <sub>R</sub> [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Límite de reproducibilidad, $R$ [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Tipos de muestras:

- A Aguardiente de ciruelas nivel de fraccionamiento (split) \*
- B Ron I; duplicados ciegos
- C Ron II; nivel de fraccionamiento (split) \*
- D Slivovitz; duplicados ciegos
- E Brandy; duplicados ciegos
- F Aguardiente de orujo; duplicados ciegos

[1] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies", Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332-343.

[2] Horwitz, W. (1982) "Analytical Chemistry 54, 67A-76A".».

3) Se añade el capítulo VIII siguiente:

#### «VIII. AZÚCARES TOTALES

##### 1. **Ámbito de aplicación**

El método HPLC-RI es aplicable para determinar los azúcares totales (expresado en azúcar invertido) en las bebidas espirituosas, con la exclusión de los licores que contengan huevos y productos lácteos.

Ha sido validado en un estudio interlaboratorios para el pastís, el anís destilado, el licor de cerezas, la crème de (seguido del nombre de una fruta o de la materia prima utilizada) y la crème de cassis, en niveles que oscilan entre 10,86 g/l y 509,7 g/l. No obstante, la linealidad de la respuesta del instrumento fue probada para concentraciones comprendidas entre 2,5 g/l y 20,0 g/l.

Este método no está concebido para la determinación de bajos niveles de azúcares.

## 2. Referencias normativas

ISO 3696: 1987 Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo.

## 3. Principio

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución de soluciones de azúcar con objeto de determinar las concentraciones de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

Este método emplea una fase estacionaria alquilamina y detección por refractometría diferencial y se ofrece como ejemplo. También podrían emplearse resinas intercambiadoras de aniones como fase estacionaria.

## 4. Reactivos y materiales

- 4.1. Glucosa (CAS 50-99-7), de una pureza de por lo menos 99 %.
- 4.2. Fructosa (CAS 57-48-7), de una pureza de por lo menos 99 %.
- 4.3. Sacarosa (CAS 57-50-1), de una pureza de por lo menos 99 %.
- 4.4. Lactosa (CAS 5965-66-2), de una pureza de por lo menos 99 %.
- 4.5. Monohidrato de maltosa (CAS 6363-53-7), de una pureza de por lo menos 99 %.
- 4.6. Acetonitrilo puro (CAS 75-05-8) para el análisis por H.P.L.C..
- 4.7. Agua destilada o desmineralizada, preferentemente microfiltrada.

### 4.8. Solventes (ejemplo)

El solvente de elución se compone de:

75 partes por volumen de acetonitrilo (4.6),

25 partes por volumen de agua destilada (4.7).

Desgasificar mediante burbujeo de helio a bajo caudal durante 5 a 10 minutos antes de la utilización.

Si el agua empleada no ha sido microfiltrada, se recomienda filtrar el disolvente en un filtro para disolventes orgánicos con un diámetro de poros inferior o igual a 0,45 µm.

- 4.9. Etanol absoluto (CAS 64-17-5).
- 4.10. Solución de etanol (5 %, v/v).
- 4.11. Preparación de las soluciones madres de calibración (20 g/l)

Pesar 2 g de cada uno de los azúcares que deben analizarse (4.1. a 4.5.), transferirlos sin pérdida a un matraz aforado de 100 ml. (Nota: 2,11 g de monohidrato de maltosa equivalen a 2 g de maltosa).

Ajustar a 100 ml con una solución de alcohol al 5 % vol. (4.10), agitar y almacenar a aproximadamente + 4 °C. Preparar una nueva solución madre una vez por semana.

### 4.12. Preparación de las soluciones hijas de calibración (2,5, 5,0, 7,5, 10,0 y 20,0 g/l)

Diluir la solución madre a 20 g/l, (4.11) de manera conveniente con una solución de alcohol de 5 % vol. (4.10) para obtener cinco soluciones estándar de 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 y 20,0 g/l. Filtrar con un filtro con poros de un diámetro inferior o igual a 0,45 µm (5.3.).

## 5. Instrumental y equipo

5.1. Sistema H.P.L.C. capaz de realizar la vuelta a la línea de base cuando se ha finalizado el análisis de todos los azúcares.

5.1.1. Cromatografía líquida de alto rendimiento con una válvula de inyección de seis vías equipada de un bucle de 10  $\mu\text{l}$  o de cualquier otro dispositivo automático o manual, para la inyección fiable de microvolúmenes.

5.1.2. Sistema de bombeo que permita realizar y mantener un caudal constante o programado con gran precisión.

5.1.3. Refractómetro diferencial.

5.1.4. Integrador o registrador informático compatible con el resto de la instalación.

5.1.5. Precolumna:

Se recomienda que se coloque una precolumna apropiada antes de la columna analítica.

5.1.6. Columna (ejemplo):

Material: acero inoxidable o vidrio

Diámetro interno: 2-5 mm.

Longitud: 100-250 milímetros (variable en función de la granulometría), por ejemplo, 250 milímetros si las partículas tienen 5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Fase estacionaria: agrupamientos funcionales de alquilamina adheridos a sílice, granulometría máxima 5  $\mu\text{m}$ .

5.1.7. Condiciones cromatográficas (ejemplo):

Disolvente de elución (4.8), caudal: 1 ml/minuto.

Detección: Refractometría diferencial.

Para asegurarse de que el detector esté perfectamente estable, puede recomendarse que se ponga en marcha unas cuantas horas antes de su empleo. La célula de referencia debe ser llenada con disolvente de elución.

5.2. Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg

5.3. Dispositivo de filtración para pequeños volúmenes utilizando una micromembrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

## 6. Almacenamiento de la muestra

En el momento de su recepción, las muestras deben ser almacenadas a temperatura ambiente antes del análisis.

## 7. Procedimiento

7.1. PARTE A: Preparación de la muestra

7.1.1. Agitar la muestra.

7.1.2. Filtrar la muestra utilizando un filtro con un diámetro de poros inferior o igual a 0,45  $\mu\text{m}$  (5.3).

7.2. PARTE B: H.P.L.C.

7.2.1. Determinación

Injectar 10  $\mu\text{l}$  de las soluciones de calibrado (4.12.) y las muestras (7.1.2.). Efectuar el análisis en condiciones apropiadas de cromatografía, por ejemplo como las descritas anteriormente.

- 7.2.2. Si cualquier pico de una muestra tiene una superficie (o altura) más grande que el pico correspondiente en la solución de calibrado más concentrado, entonces la muestra deberá ser diluida con agua destilada y analizada de nuevo.

## 8. Cálculo

Comparar los dos cromatogramas obtenidos para la solución patrón y la bebida espirituosa. Identificar los picos por su tiempo de retención. Medir su superficie (o altura) para calcular las concentraciones por el método de calibrado externo. Tener en cuenta todas las diluciones hechas durante la preparación de la muestra.

El resultado final es la suma de sacarosa, maltosa, lactosa, glucosa y fructosa, expresado en azúcar invertido en g/l.

El azúcar invertido se calcula como la suma de todos los monosacáridos y disacáridos reductores presentes, más la cantidad estequiométrica de glucosa y fructosa calculada a partir de la sacarosa presente.

$$\begin{aligned} \text{Azúcar invertido (g/l)} &= \text{glucosa (g/l)} + \text{fructosa (g/l)} + \text{maltosa (g/l)} + \text{lactosa (g/l)} + (\text{sacarosa (g/l)} \times 1,05) \\ 1,05 &= \frac{(\text{peso molecular de la fructosa} + \text{peso molecular de la glucosa})}{\text{peso molecular de la sacarosa}} \end{aligned}$$

## 9. Características de rendimiento del método (precisión)

### 9.1. Resultados estadísticos del estudio interlaboratorios

Los datos siguientes han sido obtenidos a partir de un estudio internacional de rendimiento del método efectuado según los procedimientos reconocidos internacionalmente [1] [2].

Año del estudio interlaboratorios 2000

Número de laboratorios 24

Número de muestras 8

[1] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies", Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332-343.

[2] Horwitz, W. (1982) "Analytical Chemistry 54, 67A-76A".

Cuadro 1

### Fructosa, glucosa, maltosa

Analito	Fructosa		Glucosa			Maltosa	
	Crème de cassis	Norma (50 g/l)	Bebida espirituosa anisada	Crème de cassis	Norma (50 g/l)	Bebida espirituosa anisada	Norma (10 g/l)
Valor medio [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Número de laboratorios sin valores anómalos	21	22	21	23	19	21	22
Desviación estándar de repetibilidad, s <sub>r</sub> [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54

Analito	Fructosa		Glucosa			Maltosa	
	Crème de cassis	Norma (50 g/l)	Bebida espirituosa anisada	Crème de cassis	Norma (50 g/l)	Bebida espirituosa anisada	Norma (10 g/l)
Muestras ( $\times 2$ )							
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Límite de repetibilidad, $r$ [g/l] ( $r = 2,8 \times sr$ )	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [g/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times sR$ )	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

Cuadro 2

**Sacarosa**

Analito	Sacarosa					
	Pastis	Ouzo	Licor de cerezas	Crème de menthe	Crème de cassis	Norma (100 g/l)
Muestras						
Valor medio [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Número de laboratorios sin valores anómalos	19	19	20	18	18	18
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Límite de repetibilidad, $r$ [g/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [g/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(\*) nivel de fraccionamiento (split)

Cuadro 3

**Azúcares totales**

(Nota: Estos datos se calcularon para los azúcares totales, no para el azúcar invertido tal como se define en la sección 8.)

Muestras	Pastis	Ouzo	Bebida espi- rituosa anisada	Licor de cerezas	Crème de menthe	Crème de cassis	Norma (220 g/l)
Valor medio [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Número de laboratorios sin valores anómalos	20	19	20	20	18	18	19
Desviación estándar de repe- tibilidad, $s_r$ [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Límite de repetibilidad, $r$ [g/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Desviación estándar de re- producibilidad, $s_R$ [g/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(\*) nivel de fraccionamiento (split).

4) Se añade el capítulo X siguiente:

«X. **DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE MADERA SIGUIENTES EN LAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (H.P.L.C): FURFURAL, 5-HIDROXI METIL FURFURAL, 5-METIL FURFURAL, VANILLINA, SIRINGALDEHÍDO, CONIFERALDEHÍDO, SINAPALDEHÍDO, ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO ELÁGICO, ÁCIDO VANÍLICO, ÁCIDO SIRÍNGICO Y ESCOPOLETINA**

1. **Ámbito de aplicación**

El método tiene por objeto determinar el furfural, el 5-hidroxi metil furfural, el 5-metil furfural, la vanillina, el siringaldehído, el coniferaldehído, el sinapaldehído, el ácido gálico, el ácido elágico, el ácido vanílico, el ácido siríngico y la escopoletina por cromatografía líquida de alta eficacia.

2. **Referencia normativa**

Método de análisis reconocido por la Asamblea General de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) y publicado por la OIV con la referencia OIV-MA-BS-16: R2009.

3. **Principio**

Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (H.P.L.C), con detección por espectrofotometría ultravioleta a varias longitudes de onda y por espectrofluorimetría.

#### 4. **Reactivos**

Los reactivos deben ser de calidad analítica. El agua utilizada debe ser agua destilada o un agua de pureza al menos equivalente. Es recomendable utilizar agua microfiltrada con una resistividad de 18,2 M  $\Omega$ .cm.

4.1. Alcohol de 96 % vol.

4.2. Metanol calidad H.P.L.C. (Solvente B).

4.3. Ácido acético diluido al 0,5 % vol. (Solvente A).

4.4. Fases móviles: (indicado únicamente a modo de ejemplo).

Solvente A (ácido acético al 0,5 %) y solvente B (metanol puro). Filtrar sobre membrana (porosidad 0,45  $\mu$ m). Desgasificar en baño de ultrasonidos si es necesario.

4.5. Patrones de referencia al 99 % de pureza mínima: furfural, 5-hidroxi metil furfural, 5-metil furfural, vanillina, siringaldehído, coniferaldehído, sinapaldehído, ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido siríngico y escopoletina.

4.6. Solución de referencia: las sustancias patrones se disuelven en una solución hidroalcohólica al 50 % vol. Las concentraciones finales en la solución de referencia son:

furfural: 5 mg/l; 5-hidroximetilfurfural: 10 mg/l; 5-metil furfural: 2 mg/l; vanillina: 5 mg/l; siringaldehído: 10 mg/l; coniferaldehído: 5 mg/l; sinapaldehído: 5 mg/l; ácido gálico: 10 mg/l; ácido elágico: 10 mg/l; ácido vanílico: 5 mg/l; ácido siríngico: 5 mg/l; escopoletina: 0,5 mg/l.

#### 5. **Instrumental**

Instrumental estándar de laboratorio.

5.1. Un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia capaz de funcionar en gradiente binario y provisto de:

5.1.1. Un detector espectrofotométrico capaz de medir una longitud de onda a 260 y 340 nm. Sin embargo, es preferible trabajar con un detector de longitudes de onda múltiples, por ejemplo de diodos alineados, para poder confirmar la pureza de los picos.

5.1.2. Un detector por espectrofluorimetría de longitud de onda de excitación: 354 nm, longitud de onda de emisión: 446 nm (para la determinación final de la escopoletina; pero esta última también es detectable a 313 nm por espectrofotometría).

5.1.3. Un dispositivo de inyección que permita introducir una toma de muestra de 10 o 20  $\mu$ L (por ejemplo).

5.1.4. Una columna para cromatografía líquida de alta eficacia de tipo RP C18, granulometría máxima de 5  $\mu$ m.

5.2. Jeringas para H.P.L.C.

5.3. Dispositivo de filtración de pequeños volúmenes en membrana.

5.4. Integrador-calculadora o grabador con prestaciones compatibles con el conjunto del instrumental. En particular, debe tener varios canales de adquisición.

#### 6. **Procedimiento**

6.1. Preparación de la solución que debe inyectarse

Filtrar la solución de referencia y la bebida espirituosa si es necesario por una membrana con un diámetro máximo de poros de 0,45  $\mu$ m.

- 6.2. Condiciones cromatográficas: efectuar el análisis a temperatura ambiente utilizando el equipo descrito en (5.1) y utilizando las fases móviles (4.4) con un caudal de unos 0,6 ml por minuto, según el programa siguiente (indicado únicamente a modo de ejemplo)

Tiempo: 0 min 50 min 70 min 90 min

solvente A (agua-ácido): 100 % 60 % 100 % 100 %

solvente B (metanol): 0 % 40 % 0 % 0 %

Sin embargo, en algunos casos, este gradiente deberá modificarse para evitar las coeluciones.

### 6.3. Determinación

- 6.3.1. Inyectar los patrones de referencia por separado, y seguidamente mezclados.

Adaptar las condiciones del procedimiento de modo que los factores de resolución de los picos de todos los compuestos sean al menos iguales a 1.

- 6.3.2. Inyectar la muestra preparada de conformidad con el punto 6.1.

- 6.3.3. Medir la superficie de los picos en la solución de referencia y en la bebida espirituosa y calcular las concentraciones.

## 7. Expresión de los resultados

Expresar la concentración de cada constituyente en mg/l.

## 8. Características del rendimiento del método (precisión)

Los datos siguientes se obtuvieron en 2009 a partir de un estudio internacional de rendimiento del método sobre las bebidas espirituosas diversas, efectuado según los procedimientos internacionalmente reconocidos [1], [2].

### 8.1. Furfural

Analito	Furfural						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes	15	15	15	15	15	15	15
Número de resultados aceptados (laboratorios)	14	12	13	14	13	13	13
Valor medio [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9	
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20	
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5	

Analito	Furfural						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Límite de repetibilidad, r [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Desviación estándar de re- producibilidad, $s_r$ [mg/l]		0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]		8	15	5	13	3	5
Límite de reproducibilidad, R [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

## 8.2. 5-Hidroximetilfurfural

Analito	5-Hidroximetilfurfural						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios par- ticipantes		16	16	16	16	16	16
Número de resultados acep- tados (laboratorios)		14	14	14	14	14	14
Valor medio [mg/l]		5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Desviación estándar de repe- tibilidad, $s_r$ [mg/l]		0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]		1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Límite de repetibilidad, r [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Desviación estándar de re- producibilidad, $s_R$ [mg/l]		0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]		8	9	5	13	7	9
Límite de reproducibilidad, R [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

## 8.3. 5-Metilfurfural

Analito	5-Metilfurfural						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes	11	11	11	11	11	11	11
Número de resultados aceptados (laboratorios)	11	11	8	11	10	11	11
Valor medio [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8	
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07	
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0	
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26	
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	35	18	22	39	12	35	
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7	

## 8.4. Vanillina

Analito	Vanillina						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes	16	15	16	16	16	16	16
Número de resultados aceptados (laboratorios)	16	15	16	16	16	16	16
Valor medio [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9	
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09	

Analito	Vanillina						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]		6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]		0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]		19	25	15	22	13	16
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

## 8.5. Siringaldehído

Analito	Siringaldehído						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes		16	15	16	16	16	16
Número de resultados aceptados (laboratorios)		13	13	13	12	14	13
Valor medio [mg/l]		1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]		0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]		2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]		0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]		8	33	5	6	4	4
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

## 8.6. Coniferaldehído

Analito	Coniferaldehído					
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon
Número de laboratorios participantes	13	12	13	12	13	13
Número de resultados aceptados (laboratorios)	12	12	13	12	13	13
Valor medio [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	23	27	21	23	8	19
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

## 8.7. Sinapaldehído

Analito	Sinapaldehído					
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon
Número de laboratorios participantes	14	14	14	14	15	14
Número de resultados aceptados (laboratorios)	14	13	12	13	13	12
Valor medio [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03

Analito	Sinapaldehído					
	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	31	27	46	13	10	73
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

## 8.8. Ácido gálico

Analito	Ácido gálico					
	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes	16	15	16	16	16	16
Número de resultados aceptados (laboratorios)	15	14	16	16	16	16
Valor medio [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	36	47	31	53	30	35
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

## 8.9. Ácido elágico

Analito	Ácido elágico						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes	7	7	7	7	7	7	7
Número de resultados aceptados (laboratorios)	7	7	7	7	7	7	6
Valor medio [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	13	36
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,41	0,95	0,34
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	6,3	16	3,2	3,2	3,2	7,4	1,0
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,6	0,4	0,9	1,1	1,1	2,7	1,0
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	5,0	4,9	14
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	44	43	42	39	39	39	40
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	4,0	1,2	11	14	14	14	40

## 8.10. Ácido vainílico

Analito	Ácido vainílico						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes	15	15	15	15	15	15	15
Número de resultados aceptados (laboratorios)	12	11	14	14	14	15	14
Valor medio [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	0,8	2,4	2,7
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,10	0,13	0,21

Analito	Ácido vainílico						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]		14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]		0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]		28	20	35	31	51	26
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

## 8.11. Ácido siríngico

Analito	Ácido siríngico						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes		16	15	16	16	16	16
Número de resultados aceptados (laboratorios)		16	15	15	15	16	15
Valor medio [mg/l]		0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]		0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]		6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )		0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]		0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]		19	29	11	18	13	14
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )		0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

## 8.12. Escopoletina

Analito	Escopoletina						
	Muestras	Whisky	Brandy	Ron	Cognac 1	Bourbon	Cognac 2
Número de laboratorios participantes	10	10	10	10	10	10	10
Número de resultados aceptados (laboratorios)	9	8	9	8	8	8	8
Valor medio [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15	
Desviación estándar de repetibilidad, $s_r$ [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040	
Desviación estándar relativa de repetibilidad, $RSD_r$ [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7	
Límite de repetibilidad, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0 007	0 002	0 005	0 004	0 015	0 011	
Desviación estándar de reproducibilidad, $s_R$ [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02	
Desviación estándar relativa de reproducibilidad, $RSD_R$ [%]	15	16	23	17	15	15	
Límite de reproducibilidad, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06	

[1] "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies", Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332-343.

[2] Horwitz, W. (1982) "Analytical Chemistry 54, 67A-76A".».