RESOLUTION OIV-OENO 477-2013

METHODE DE DOSAGE DE PHTALATES DANS LES VINS PAR COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE ET SPECTROMETRIE DE MASSE

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,

DECIDE sur proposition de la Commission II "Oenologie" d'introduire la méthode de type IV suivante au « *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et mouts»:*

Méthode de dosage des phtalates dans les vins par couplage chromatographie gazeuse/ spectrométrie de masse

Type de Méthode : IV

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la recherche et au dosage de phtalates dans les vins.

2. PRINCIPE

L'échantillon est soumis à une extraction par de l'isohexane. L'extrait est concentré par évaporation. On procède à l'analyse de l'extrait concentré par couplage chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS) avec étalons internes deutérés.

3. REACTIFS ET PRODUITS

Sauf spécification contraire, tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique reconnue.

3.1. DMP (Ddi-méthyl phtalate) [n° CAS : 131-11-3]

3.2. DnBP (di-butyl phtalate) [n° CAS : 84-74-2]

3.3. DEHP (bis-(2-éthylhexyl) phtalate) [n° CAS : 117-81-7]

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

3.4. BBP (Butyl benzyl phtalate) [n° CAS 85-68-7]
3.5. DINP (di-isononyl phtalate) [n° CAS : 068515-48-0/028553-12-0]
3.6. DIDP (di-isodécyl phtalate) [n° CAS : 068515-49-1/026761-40-0
3.7. DCHP (dicyclohexyl phtalate) [n° CAS : 84-61-7]
3.8. DEP (diéthyl phtalate) [n° CAS : 84-66-2]
3.9. DiBP (di-isobutyl phtalate) [n° CAS : 84-74-2]
3.10. DnOP (di-n-octyl phtalate) [n° CAS : 117-84-0]
3.11. DMP-d4 : standard interne [n° CAS : 93951-89-4]
3.12. DEP-d4 : standard interne [n° CAS : 93952-12-6]
3.13. DiBP-d4 : standard interne [n° CAS : 358730-88-8]
3.14. DnBP-d4 : standard interne [n° CAS : 93952-11-5]
3.15. BBP-d4 : standard interne [n° CAS : 93951-88-3]
3.16. DCHP-d4 : standard interne [n° CAS : 358731-25-6]
3.17. DEHP–d4: standard interne [n° CAS : 93951-87-2]
3.18. DnOP-d4 : standard interne [n° CAS : 93952-13-7]
3.19. Isohexane [n° CAS : 107-83-5] et Acétone [n° CAS :67-64-1]
3.20. Solutions étalons

Toutes les fioles jaugées utilisées pour préparer les solutions d'étalonnage seront rincées à l'acétone puis à l'isohexane pour éviter toute contamination

3.20.1. Solutions mères

- Phtalate-solution individuelle à 1 g/L : pour chaque phtalate peser 100 mg dans une fiole de 100 mL, dissoudre dans l'isohexane et compléter à 100 mL.
- DINP-DIDP solution individuelle à 5g/L : peser pour chacun d'eux 500mg dans une fiole de 100 mL, dissoudre dans l'isohexane et compléter à 100 mL.
- Etalon interne-solution individuelle à 0,5 g/L : les étalons deutérés sont conditionnés dans des ampoules scellées de 25mg ; pour chaque étalon interne la totalité de chaque ampoule est transférée dans une fiole jaugée de 50 mL ;ajuster à 50mL avec l'isohexane.

3.20.2. Solutions filles

- Solution fille phtalates **F1** à 1 mg/L

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

Prélever 100 µL de chaque solution mère à 1 g/L et 5g/L («3.20.1), les introduire dans une fiole de 100 mL, compléter à 100 mL avec de l'isohexane.

- Solution fille phtalates **F2** à 10 mg/L

Prélever 1 mL de chaque solution mère à 1 g/L et 5g/L (3.20.1), les introduire dans une fiole de 100 mL, compléter à 100 mL avec de l'isohexane.

- Solution fille étalons internes EI à 10 mg/L

Prélever 1 mL de chaque solution mère d'étalon deutéré à 0,5 g/L (3.20.1), les introduire dans une fiole de 50 mL, compléter à 50 mL avec de l'isohexane.

3.20.3. Gamme d'étalonnage

A partir des différentes solutions filles (4.20.2), on prépare la gamme d'étalonnage dans l'isohexane directement dans les flacons pour injection préalablement traités thermiquement, rincés (cf § 6.1) et séchés sous hotte, selon le tableau ci-dessous :

Points de calibration	Conc. en phtalate (mg/L)*	Vol. Sol. fille F1 (µL)	Vol. Sol. fille F2 (µL)	Vol. sol. fille EI (µL)	Vol. isohexane (µL)
C1	0	0	0	50	1000
C2	0,05	50	0	50	950
C3	0,10	100	0	50	900
C4	0,20	200	0	50	800
C5	0,50	0	50	50	950
C6	0,80	0	80	50	920
C7	1,00	0	100	50	900

* pour DINP et DIDP concentrations à multiplier par 5

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

4. MATERIEL

4.1. Verrerie et matériels volumétriques de laboratoire :

4.1.1. Fioles jaugées, 50 mL et 100ml de classe A

4.1.2. Tubes à centrifuger en verre avec bouchon 50 mL

4.1.3. Tubes à essai en verre avec bouchon 10mL

4.1.4. Micropipettes à volumes variables de 25 µl à 1000µl vérifiées selon ISO 8655-6

4.1.5. Evaporateur sous flux d'azote

4.2. Balance analytique

4.3. Système CG-MS (par exemple : 450GC-300MS Varian)

5. MODE OPERATOIRE

5.1. Précautions

Du fait de la présence de phtalates dans l'environnement du laboratoire, l'analyse de ces composés nécessite des précautions tout au long de l'analyse :

- Eviter tout contact avec du matériel en matière plastique (tout particulièrement les PVC souples) dans la mesure du possible. Dans le cas contraire s'assurer que cela n'apporte pas de contamination.
- Tester les solvants utilisés et dédier des bouteilles de solvant à ces analyses.
- Utiliser de la verrerie traitée thermiquement, uniquement la verrerie **non jaugée** (400°C pendant au moins 2h). Rincer soigneusement tout le matériel (acétone puis isohexane).
- S'assurer que les septum des flacons d'injection sont exempts de phtalates.
- Avant et après chaque injection, rincer plusieurs fois la seringue d'injection.
- Si possible manipuler dans une salle blanche ou une salle dédiée à ces analyses.

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

5.2. Préparation des échantillons

Dans un tube à centrifuger de 50 mL introduire 12,5 mL d'échantillon. Ajouter 10 mL d'isohexane.

Agiter vigoureusement (vortex) pendant au moins une minute.

Laisser décanter le mélange jusqu'à séparation des 2 phases (un passage au bain à ultra-sons30 minutes à 50°C permet d'accélérer la séparation des deux phases). Récupérer 8 mL de la phase organique et transférer dans un tube à essai de 10 mL. Evaporer sous courant d'azote (0,3 bar) à 35°C en évitant d'aller à sec (attention : la température ne doit pas dépasser 40°C)

Reprendre avec 1 mL d'isohexane.

Ajouter 50µl de solution de l'étalon interne à 0,01 g/L dans chaque extrait.

Transférer dans un flacon d'injection.

NOTE : pour minimiser les effets matrices lors de l'analyse par GC-MS, il est possible d'utiliser l'ajout d'un agent « protectant », par exemple l'undécanoate de méthyle [n°CAS : 1731-86-8].

20µL de cette substance sont ajoutés dans chaque solution d'étalonnage et dans les extraits des échantillons avant d'évaporer sous courant d'azote.

5.3. Essai à blanc

Préparer un « blanc » en suivant le mode opératoire décrit en 5.2 sans mettre l'échantillon.

5.4. Analyse par GC/MS

En fonction de l'appareillage disponible et de ses performances, choisir pour la spectrométrie de masse entre le mode SIM et le mode MRM

A titre informatif, des conditions d'analyses sont données en annexe I et un chromatogramme type en annexe II.

5.4.1. Etalonnage

Effectuer en premier plusieurs injections de solvant (minimum 2). Injecter ensuite les solutions étalons (3.20.3) en double dans l'ordre croissant de concentration et terminer par au moins deux injections de solvant.

Etablir pour chaque phtalate une courbe de calibration :

- $(A_{analyte}/A_{IS}) = f(C_{analyte}/C_{IS})$.

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

A : aire du pic

C : concentration

IS : standard interne

Chaque phtalate est quantifié par rapport à l'étalon deutéré correspondant sauf le DINP et le DIDP qui sont quantifiés par rapport au DnOP-d4.

5.4.2. Analyse des échantillons

Commencer la séquence d'analyse par l'analyse du « blanc » (5.3).

Injecter ensuite les échantillons préparés (5.2) en double.

Prévoir des injections de solvant après les échantillons potentiellement très contaminés.

Terminer la série par l'injection d'un ou plusieurs points de gamme pour vérifier une éventuelle dérive de signal au cours de la série d'analyse et de plusieurs injections de solvant.

- Pour chaque injection, mesurer l'aire des pics identifiés et des standards internes et utiliser l'équation de la courbe d'étalonnage (5.4.1) pour déterminer la concentration dans l'extrait analysé.

5.4.3. Expression des résultats

Pour chaque échantillon, faire la moyenne des résultats obtenus (5.4.2) pour les deux injections.Les résultats sont exprimés en mg/L .

6. CONTROLE QUALITE

Dans chaque série d'analyses, un contrôle qualité est mis en place par l'analyse d'un échantillon de vin supplémenté en phtalates à un niveau de concentration de 0,020mg/L.

L'extrait de l'échantillon préparé selon 6.2 est analysé au début de série, les résultats obtenus, exprimés en taux de rendement, sont reportés sur une carte de contrôle.

7. CHARATERISTIQUES DE LA METHODE

Les analyses réalisées au laboratoire, dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire, sur un vin rouge et un vin blanc supplémentés en phtalates à deux niveaux de concentration (0,040 mg/L et 0,080 mg/L) ont permis de déterminer les

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

valeurs de répétabilité (CV_r%), de reproductibilité intermédiaire (CV_{RI}%) et de rendement suivantes :

Phtalates	%Rdt	CV_r%	CV_{FI}%
DMP (di-methyl-phtalate)	67	5	8
DEP (di-ethyl phtalate)	84	8	11
DiBP (di-isobutyl phtalate)	93	7	10
DnBP (di-butyl phtalate)	95	5	7
BBP (butyl benzyl phtalate)	98	5	6
DCHP (di-cyclohexyl phtalate)	97	5	7
DEHP (bis-2-ethylhexyl phtalate)	98	6	7
DnOP (di-octyl phtalate)	98	6	7
DINP (di-isononyl phtalate)	104	7	8
DIDP (di-isodecyl phtalate)	96	8	11

Soit pour l'ensemble des phtalates, les valeurs moyennes suivantes :
Répétabilité (exprimée en CVr%) : **6%**
Fidélité intermédiaire (exprimée en CV_{FI}%) : **8%**

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

8. LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION

Pour chaque phtalate recherché, les limites de détection et de quantification sont données dans le tableau suivant :

Phtalates	Limite de quantification (mg/L)	Limite de détection (mg/L)
DMP (di-methyl-phtalate)	0,010	0,004
DEP (di-ethyl phtalate)	0,010	0,004
DiBP (di-isobutyl phtalate)	0,010	0,004
DnBP (di-butyl phtalate)	0,010	0,004
BBP (butyl benzyl phtalate)	0,010	0,004
DCHP (di-cyclohexyl phtalate)	0,010	0,004
DEHP (bis-2-ethylhexyl phtalate)	0,010	0,004
DnOP (di-octyl phtalate)	0,010	0,004
DINP (di-isononyl phtalate)	0,050	0,020

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

DIDP (di-isodecyl phtalate)	0,050	0,020

9. REFERENCES

1. FV 1371. Recherche et dosage de phtalates dans les boissons alcoolisées. 2011
2. FV 1234. Questions sur les Phtalates. 2006

ANNEXE I (informative)

Conditions pour la chromatographie gazeuse

Colonne capillaire de type VF-5ms : 30m x 0,25 mm diamètre interne, 0,25 µm d'épaisseur de film

- Programme de températures :
- Pour une détection en mode SIM :

Four maintenu à 100 °C pendant 1 min ; monter à 230 °C à 10 °C/min ; monter à 270 °C à 10 °C/min ; maintien pendant 2 min, monter à 300 °C à 25 °C/min ; maintien pendant 8 min.
Remarque : cette programmation permet de séparer les pics du DEHP et du DCHP (ce qui n'est pas le cas avec la programmation du mode MRM)

- Pour une détection en mode MRM :

Four maintenu à 80 °C pendant 1 min ; monter à 200 °C à 20 °C/min ; monter à 300°C à 10 °C/min ; maintien pendant 8 min.
Injecteur : maintenu à 150°C pendant 0,5 min ; monter à 280 °C à 200 °C/min, en mode sans division à l'injection
Helium : 1 mL/min à débit constant
Volume injecté : 1 µl

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

Conditions de la spectrométrie de masse (MS)

Ionisation en mode EI à 70 eV

Température de la source :250°C

Température ligne de transfert :300°C

Manifold : 40°C

Paramètres de quantification et d'identification des phtalates

Le tableau 1 indique, dans le cas d'une analyse en mode SIM, l'ion de quantification et les deux ions d'identification pour chaque phtalate et son homologue deutéré.

Le tableau 2 reprend, dans le cas d'une analyse en mode MRM, les transitions quantifiantes et qualifiantes pour chaque phtalate et son homologue deutéré.

Remarque : Le DIDP et le DINP sont chacun un mélange de composés. La chromatographie ne permet pas de les séparer complètement. Par conséquent ils sont dosés en « groupe ».

ANNEXE I (suite)

(informative)

Tableau 1

		Ion quantification m/z	Ions qualification m/z 1	2
DMP	(di-méthyl phtalate)	163	77	194
DMP-d4		167	81	198
DEP	(di-ethyl phtalate)	149	177	222
DEP-d4		153	181	226
DiBP	(di-isobutyl phtalate)	149	167	223
DiBP-d4		153	171	227
DnBP	(di-butyl phtalate)	149	205	223
DnBP-d4		153	209	227

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

BBP	(butyl benzyl phtalate)	149	91	206
BBP-d4		153	95	210
DCHP	(di-cyclohexyl phtalate)	149	167	249
DCHP-d4		153	171	253
DEHP	(bis-2-ethylhexyl phtalate)	149	167	279
DEHP-d4		153	171	283
DnOP	(di-octyl phtalate)	149	167	279
DnOP-d4		153	171	283
DINP	(di-isononyl phtalate)	149	293	
DIDP	(di-isodecyl phtalate)	149	307	

Tableau 2

		Transition quantifiante	Transition qualifiante
DMP	(di-methyl-phtalate)	194>163	194>77
DMP-d4		198>167	198>81
DEP	(di-ethyl phtalate)	177>149	177>93
DEP-d4		181>153	181>97
DiBP	(di-isobutyl phtalate)	223>149	205>149
DiBP-d4		227>153	209>153
DnBP	(di-butyl phtalate)	223>149	205>149
DnBP-d4		227>153	209>153
BBP	(butyl benzyl phtalate)	206>149	149>121
BBP-d4		210>153	153>125

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013

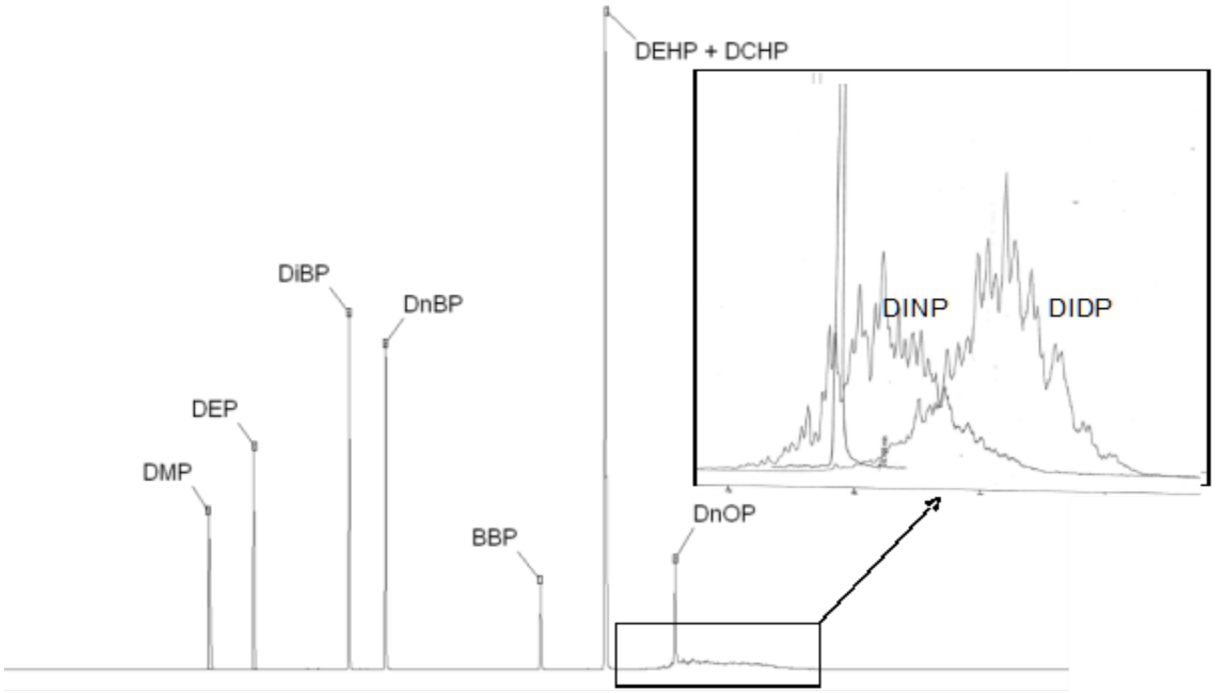
DCHP	(di-cyclohexyl phtalate)	249>149	249>93
DCHP-d4		253>153	253>97
DEHP	(bis-2-ethylhexyl phtalate)	279>149	279>93
DEHP-d4		283>153	283>97
DnOP	(di-octyl phtalate)	279>149	279>93
DnOP-d4		283>153	283>93
DINP	(di-isononyl phtalate)	293>149	
DIDP	(di-isodecyl phtalate)	307>149	

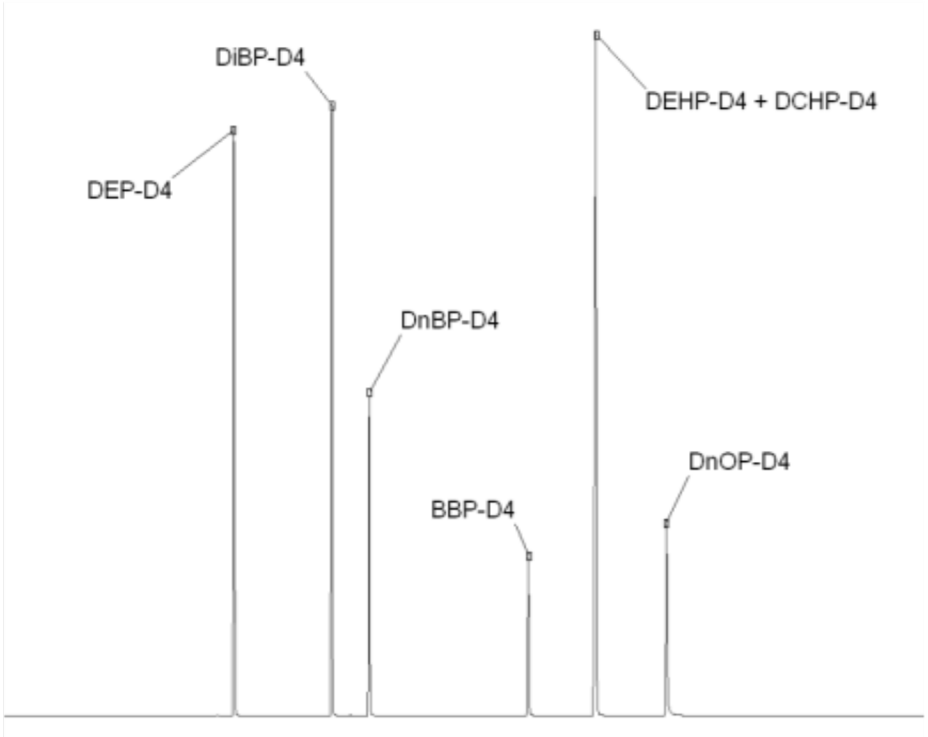
ANNEXE II (informative)

Chromatogrammes GC/MS d'une solution standard de phtalates et des étalonss internes deutérés.

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013





Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-marie AURAND

© OIV 2013