

RESOLUTION OIV/OENO 382C/2010

ACTUALISATION DU RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLES – ANALYSE DES COMPOSES α -DICARBONYLES DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE PAR HPLC APRES DERIVATION PAR LE 1,2-DIAMINO BENZENE

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 le « Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicoles » adopté en 2009

DECIDE d'introduire dans le « Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicoles » la méthode suivante

Analyse des composés α -dicarbonylés DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE PAR HPLC après dérivation par le 1,2-diaminobenzène

Méthode de type IV

1. Introduction

Les principaux composés α -dicarbonylés des eaux-de-vie de vin (Figure 1) sont : glyoxal, méthylglyoxal, diacétyle et pentane-2,3-dione. Glyoxal : $\text{OCH}-\text{CHO}$ (éthanedial)

Méthylglyoxal : $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CHO}$ (2-oxopropanal)

Diacétyle : $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CO}-\text{CH}_3$ (butane-2,3-dione)

Pentane-2,3-dione : $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CO}-\text{CH}_3$

Hexane-2,3-dione : $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CO}-\text{CH}_3$

Figure 1. Les principaux composés α -dicarbonylés des eaux-de-vie de vin (l'hexane-2,3-dione n'est pas naturellement présente mais elle est utilisée comme étalon interne).

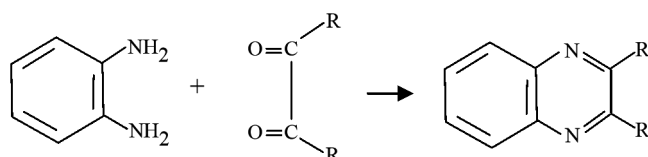
Les composés dicarbonylés sont importants en raison de leur impact sensoriel.

2. Domaine d'application

Cette méthode s'applique aux boissons spiritueuses d'origine vitivincicole pour des composés dicarbonylés dont la teneur est comprise entre 0,05 mg/L et 20 mg/L ;

3. Principe

La méthode est basée sur la formation de dérivés de type quinoxaline à partir des composés α -dicarbonylés avec le 1,2-diaminobenzène (figure 2).



1,2-Diaminobenzène Dicarbonyle Quinoxaline

Figure 2 Formation des dérivés

.La réaction a lieu dans la boisson spiritueuse diluée au quart, à pH 8 et après une durée de réaction de 3 h à 60 °C. L'analyse des dérivés est ensuite effectuée directement par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et détection par absorption UV à 313 nm.

4. Réactifs et produits

4.1. Composés dicarbonylés

4.1.1. Glyoxal (n° cas 107-22-3) en solution à 40 %

4.1.2. Méthylglyoxal (n° cas 78-98-8) en solution à 40 %

4.1.3. Diacétyle (n° cas 431-03-8) de pureté > 99 %

4.1.4. Pentane-2,3-dione (n° cas 600-14-6) de pureté > 97 %

- 4.1.5. Hexane-2,3-dione (n° cas 3848-24-6) de pureté > 90 %
- 4.2. 1,2-Diaminobenzène (n° cas 95-54-5) sous forme de poudre, de pureté > 97 %
- 4.3. Eau pour HPLC (selon la norme EN ISO 3696)
- 4.4. Ethanol (n° cas 64-17-5) pur pour HPLC
- 4.5. Hydroxyde de sodium (n° cas 1310-73-2) en solution 0,1M
- 4.6. Acide acétique (n° cas 64-19-7) pur cristallisable
- 4.7. Solvant A pour l'analyse par HPLC

Dans 1 l d'eau pour HPLC (4.3) rajouter 0,5 ml d'acide acétique (4.6), mélanger, dégazer (par exemple par ultrasons)

- 4.8. Solvant B pour HPLC

Méthanol (n° cas 67-56-1) pur HPLC

- 4.9. Solution hydroalcoolique à 50 % vol.

Mélanger 50 ml d'éthanol pur pour HPLC (4.4) avec 50 ml d'eau (4.3)

- 4.10. Solution d'étalon interne hexane-2,3-dione à 2,0 g/L

Placer 40 mg d'hexane-2,3-dione (4.2) dans un flacon de 30 ml, diluer dans 20 ml de solution hydroalcoolique à 50 % vol (4.9) agiter jusqu'à dissolution complète.

5. Appareillage

- 5.1. Chromatographe en phase liquide à haute performance avec détection par absorption UV (313 nm) ;

5.1.1. Colonne analytique remplie de silice greffée par des radicaux octadécyle de 5 µm dont les dimensions sont par exemple 250 mm x 4,6 mm.

- 5.1.2. Système d'acquisition des données.

- 5.2. Appareil de mesure du pH

- 5.3. Agitateur magnétique

- 5.4. Balance de précision à 0,1 mg.

- 5.5. Système de dégazage des solvants pour HPLC (par exemple appareil à ultrasons)

- 5.6. Four pouvant être réglé à 60 °C

- 5.7. Verrerie courante de laboratoire dont pipettes, flacons à vis de 30 ml et micro-seringues.

6. Préparation de l'échantillon

Diluer la boisson spiritueuse au quart dans l'eau (4.3)

7. Mode opératoire

Placer 10 ml de boisson spiritueuse diluée au quart (6) dans un flacon de 30 ml (5.7)

Amener à pH 8 sous agitation, avec de l'hydroxyde de sodium 0,1 M (4.5)

Ajouter 5 mg de 1,2-diaminobenzène (4.2)

Ajouter 10 µl d'hexane-2,3-dione (étalon interne) à 2,0 g/l (4.10).

Fermer le flacon à l'aide d'un bouchon à vis muni d'un joint à face téflonée

Agiter jusqu'à disparition complète du réactif (5.3)

Placer dans le four à 60 °C pendant 3 h. (5.6)

Refroidir.

7.1. Analyse

- *Injection.* Après refroidissement, le milieu réactionnel contenant les quinoxalines est directement injecté à raison de 20 µl dans le système HPLC
- *Programme d'élution.* Pour la séparation, un exemple de programme d'élution est présenté dans le tableau 1

Tableau 1. Exemple de programme d'élution de l'analyse par HPLC

Temps en minutes	Solvant A	Méthanol
0	80	20
8	50	50
26	25	75
30	0	100
32	0	100
40	100	0
45	80	20

50

80

20

Le débit étant de 0,6 ml/min

- *Détection.* Le maximum d'absorption a été étudié pour tous les composés dicarboxylés dérivés et fixé à 313 nm comme étant optimal.
- *Identification des dérivés.* L'identification des dérivés a été réalisée par comparaison des temps de rétention avec des solutions de référence étalons. Les conditions chromatographiques permettent une bonne séparation des pics dans toutes les eaux-de-vie de vins.

7.1.1. Caractéristiques de la méthode

Certains éléments de validation interne 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)

- *Linéarité.* La linéarité de la méthode a été testée en utilisant des solutions standards (solution hydroalcoolique à 12 % vol. comme matrice) (Tableau 2). L'analyse quantitative des ajouts de composés dicarboxylés a montré que la méthode est linéaire pour les quatre composés avec des taux de recouvrements compris entre 92 et 117 %

Tableau 2. Étude de la linéarité et essais de récupération avec des solutions standards (eau-éthanol 12% v/v) coefficients de corrélation

Glyoxal	Méthylglyoxal	Diacétyle	Pentane-2,3-dione
valeur ^a surface ^b	valeur ^a surface ^b	valeur ^a surface ^b	valeur ^a surface ^b
R =0,992	R =0,997	R =0,999	R =0,999

- *La limite de quantification* des composés dicarboxylés est très basse, les meilleurs résultats étant obtenus avec le diacétyle dont la limite de détection est 10 fois plus faible que celle des autres composés (tableau 3).

Tableau 3. Performance de la méthode par HPLC pour la quantification des composés dicarbonylés

Limites	détection ^a	détermination ^a	quantification ^a
Glyoxal	0,015	0,020	0,028
Méthylglyoxal	0,015	0,020	0,027
Diacétyl	0,002	0,002	0,003
Pentane-2,3-dione	0,003	0,004	0,006

a : résultats en mg/L en solution hydroalcoolique (10 % vol).

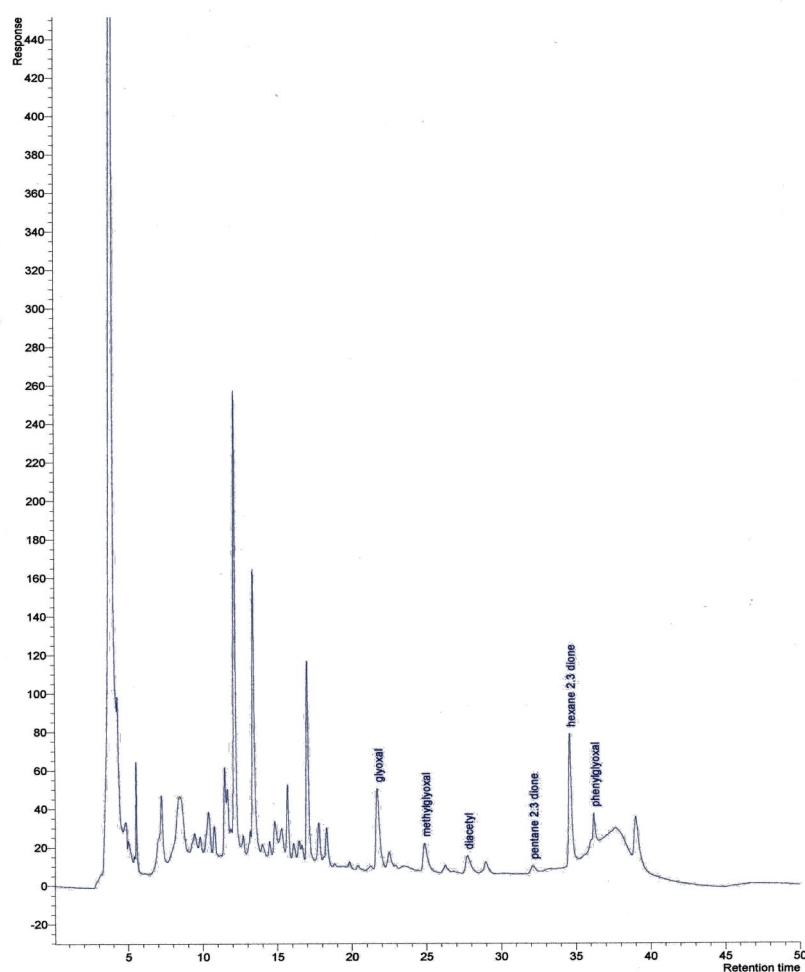


Figure 3 : Chromatogramme en phase liquide à haute performance des composés dicarbonylés dérivés par le 1,2-diaminobenzène, détectés en UV à 313 nm Colonne Sperisorb ODS 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m.

8. Bibliographie

1. Bartowski E.J. and Henschke P.A. The buttery attribute of wine - diacetyl - desirability spoilage and beyond. Int. j. food microbial. 96 : 235-252 (2004).
2. Bednarski W, Jedrychowski L, Hammond E and Nikolov L, A method for determination of α -dicarbonyl compounds. J Dairy Sci 72:2474-2477 (1989).

3. Leppanen O, Ronkainen P, Koivisto T and Denslow J, A semiautomatic method for the gas chromatographic determination of vicinal diketones in alcoholic beverages. J Inst Brew 85:278- 281 (1979).
4. Martineau B, Acree TE and Henick-Kling T, Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. Food Res Int 28:139-143 (1995).
5. Moree-Testa P and Saint-Jalm Y, Determination of α -dicarbonyl compounds in cigarette smoke. J Chromatogr 217:197-208 (1981).
6. de Revel G Pripis-Nicolau L. Barbe J.-C; and Bertrand A, The detection of α -dicarbonyl compounds in wine:by ,formation of quinoxaline derivatives. J Sci. Food Agric.80:102-108 (2000).
7. de Revel G and Bertrand A, Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes. Proc 7th Weurman Flavour Research Symp, Zeist, June, pp 353-361 (1994).
8. de Revel G and Bertrand A, A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. J Sci. Food Agric 61:267-272 (1993).
9. Voulgaropoulos A, Soilis T and Andricopoulos N, Fluorimetric determination of diacetyl in wines after condensation with 3,4-diaminoanisole. Am J Enol Vitic 42:73-75 (1991).