

RESOLUTION OIV/OENO 386B/2010

METHODE DE DETERMINATION DES COMPOSES α -DICARBONYLES DU VIN PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE APRES DERIVATION PAR LE 1,2-DIAMINO BENZENE

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,

DÉCIDE de compléter l'annexe A du Recueil International des méthodes d'analyse par la méthode de type IV suivante :

Methode de determination des composés α -dicarbonylés du vin par CPG après dérivation par le 1,2-diaminobenzène

1. Introduction

Les principaux composés α -dicarbonylés du vin (Figure 1) sont : glyoxal, méthylglyoxal, diacétyle et pentane-2,3-dione, seules les α -dicétones sont assez abondantes dans le vin. Les composés carbonylés existent dans tous les types de vins et particulièrement après la fermentation malolactique et dans les vins rouges. De plus, des vins blancs doux produits à partir de raisins botrytisés peuvent contenir des niveaux de glyoxal et de méthylglyoxal élevés.

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 du vin, (l'hexane-2,3-dione n'est pas naturellement présente dans le vin mais elle est utilisée comme étalon interne).

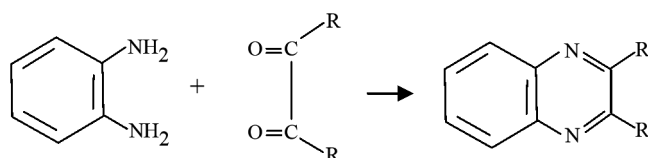
Les composés dicarbonylés sont importants dans le vin pour des raisons différentes : impact sensoriel, réactivité avec d'autres composants du vin ou possibles effets microbiologiques.

2. Domaine d'application

Cette méthode s'applique à tous types de vins (blancs, rouges, sucrés ou fortifiés), pour des teneurs en dérivés carbonylés comprises 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 du vin avec le 1,2-Diaminobenzène (figure 2).



1,2-Diaminobenzène Dicarbonyle Quinoxaline

Figure 2 Formation des dérivés

La réaction a lieu directement dans le vin à pH 8 et après une durée de réaction de 3 h à 60 °C. L'analyse des dérivés est ensuite effectuée après extraction des dérivés par le dichlorométhane et analyse par chromatographie en phase gazeuse avec une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) ou à l'aide d'un détecteur spécifique des composés azotés.

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 (par exemple microfiltrée et de résistivité de 18,2 MΩ)

- 4.4. Ethanol (n° cas 64-17-5) pur pour HPLC
- 4.5. Hydroxyde de sodium (n° cas 1310-73-2) en solution M
- 4.6. Acide sulfurique (n° cas 7664-93-9) en solution 2M
- 4.7. Dichlorométhane (n° cas 75-09-2)
- 4.8. Sulfate de sodium anhydre (n°cas 7757-82-6)
- 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.

- 4.11. Sulfate de sodium anhydre (n°cas 7757-82-6)

5. Appareillage

5.1. Chromatographie en phase gazeuse avec une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) ou à l'aide d'un détecteur spécifique des composés azotés.

5.1.1. Colonne analytique capillaire polyéthylène glycol moyennement polaire (C 20M, BP21...) avec les caractéristiques suivantes (à titre d'exemple) 50 m x 0,32 mm x 0,25 µm.

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. Four pouvant être réglé à 60 °C

5.6. Verrerie courante de laboratoire dont pipettes, flacons à vis et microseringues.

6. Préparation de l'échantillon

Aucune préparation spécifique n'est requise

7. Mode opératoire

Placer 50 ml de vin dans un flacon (5.6)

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

Ajouter 25 mg de 1,2-diaminobenzène (4.2)

Ajouter 50 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 (5.5)

Refroidir.

7.1. Optimisation et conditions analytiques (cette étude a été effectuée avec analyse par HPLC, voir cette méthode)

Le rendement de formation des dérivés des composés dicarbonylés avec le 1,2-diaminobenzène est optimal à pH 8, à 60 °C, après 3 heures de réaction.

Par ailleurs, aucune interférence du SO₂ avec la formation des quinoxalines n'a été notée lors de l'étude de la méthode.

7.2. Analyse par CPG

7.2.1. Extraction des quinoxalines

- Le milieu réactionnel préparé en 7, est amené à pH 2 à l'aide de H₂SO₄ 2M (4.6) ;
- Extraire à 2 reprises par 5 ml de dichlorométhane (4.7) par agitation magnétique durant 5 minutes ;
- Décanner la phase inférieure à chaque reprise ;
- Mélanger les deux phases de solvant ;
- Sécher sur 1 g environ de sulfate de sodium anhydre (4.11) ;
- Décanner.

7.2.2. Analyse chromatographique (donnée à titre d'exemple)

- *Détection.* Pour l'analyse par GC-MS un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard HP 5890 a été couplé avec une chemstation et un spectromètre de masse HP 5970 (impact électronique 70 eV, 2,7 kV),

Remarque Il est également possible d'utiliser un détecteur spécifique des composés azotés.

- *Colonne.* La colonne est une BP21 (SGE, 50 m x 0,32 mm x 0,25 µm).

- *Températures.* Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250 °C et 280 °C ; celle du four est maintenue à 60 °C pendant 1 min, puis programmée à raison de 2 °C/min jusqu'à 220 °C et l'isotherme finale dure 20 min.
- *Injection.* Le volume injecté est de 2 µl et le temps de fermeture des vannes de l'injecteur (splitless) est de 30 s.

7.2.3. Analyse des quinoxalines formées

- *Séparation.* Le chromatogramme des dérivés par 1,2-diaminobenzène d'un vin selon la méthode de sélection d'ions (SIM) est montré à la Figure 3. De bonnes séparations ont été obtenues avec tous les types de vins (blancs, rouges, sucrés ou fortifiés) et même de moûts en fermentation.
- *Identification des pics.* L'utilisation de la GC-MS a permis d'identifier les composés dicarbonylés dérivés du vin en utilisant la méthode du courant ionique total (scan) qui permet d'obtenir les spectres de masse des dérivés quinoxalines et de les comparer à ceux en mémoire dans la bibliothèque de spectres ; par ailleurs les temps de rétention ont été comparés avec ceux de composés purs traités de la même manière. Le tableau 1 montre les ions principaux des spectres de masse des composés dicarbonylés dérivés obtenus.
- *Dosage.* La détermination quantitative des composés dicarbonylés est effectuée avec le mode SIM, en sélectionnant des ions $M/Z = 76, 77, 103, 117, 130, 144, 158$ et 171 . Les ions $M/Z = 76$ et 77 sont utilisés pour la quantification et les autres comme qualifieurs, c'est-à-dire glyoxal : ions $M/Z = 103$ et 130 , méthylglyoxal : ions $M/Z = 117$ et 144 , diacétyle : ions $M/Z = 117$ et 158 , pentan-2,3-dione : ions $M/Z = 171$ et hexane-2,3-dione : ions $M/Z = 158$ et 171 .

7.2.4. 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)

- *Répétabilité.* La répétabilité de la méthode par GC-MS-SIM. montre des coefficients de variation compris entre 2 et 5 % pour les quatre composés dicarbonylés ;

- *Taux de récupération.* Les quantités ajoutées à un vin ont été retrouvées avec un taux de récupération variant de 92 à 117 %
- *Linéarité.* Des corrélations linéaires ont été obtenues dans des domaines de concentration compris entre 0,05 à 20 mg/l.
- *Limite de détection.* La limite de détection de la plupart des produits dicarbonylés dérivés en utilisant le vin comme matrice est de 0,05 mg/l

Tableau 1. Spectres de masse (ion m/z (intensité de l'ion moléculaire relative à celle du pic de base)) des dérivés de composés dicarbonylés par le 1,2-diaminobenzène

Composé dicarbonylé	Dérivé	Spectre de masse (principaux ions et abondance)
Glyoxal	Quinoxaline	130 (100), 103 (56.2), 76 (46.8), 50 (20.2), 75 (10.4), 131 (9.4)
Méthylglyoxal	2-Méthylquinoxaline	144 (100), 117 (77.8), 76 (40.5), 77 (23.3), 50 (21.9), 75 (11.3), 145 (10.3)
Diacétyl	2,3-Diméthylquinoxaline	117 (100), 158 (75.6), 76 (32.3), 77 (23.1), 50 (18.3), 75 (10.4)
Pentane-2,3-dione	2-Ethyl-3-méthylquinoxaline	171 (100), 172 (98), 130 (34.1), 75 (33.3), 77 (21), 50 (19.4), 144 (19), 143 (14.1), 103 (14)
Hexane-2,3-dione	2,3-Diéthylquinoxaline	158 (100), 171 (20.1), 76 (13.7), 77 (12.8), 159 (11.4), 157 (10.8), 50 (8.1)

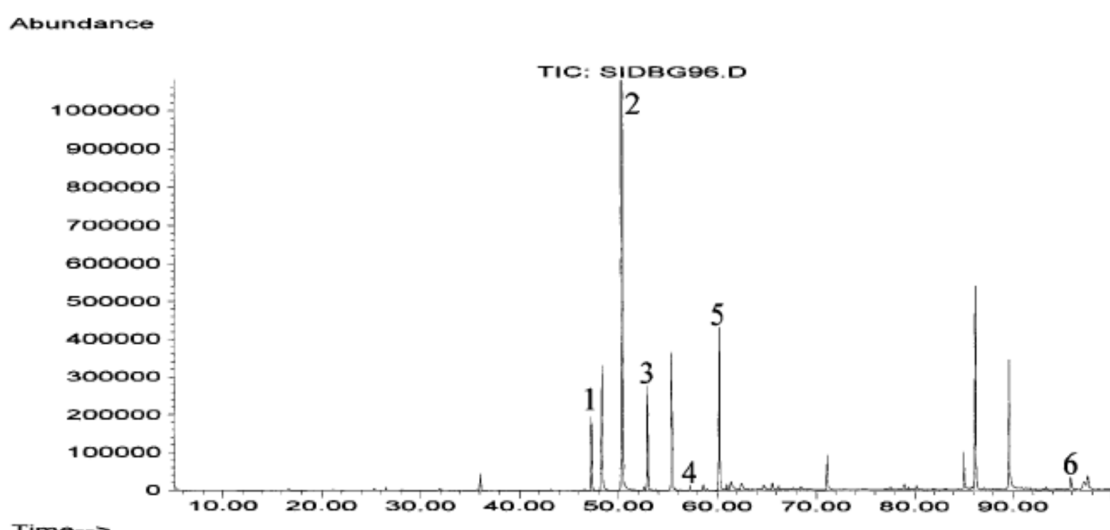


Figure 3. Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait des composés dicarbonylés dérivés par le 1,2-diaminobenzène d'un vin blanc, détectés en spectrométrie de masse en choisissant les ions $m/z = 76, 77, 103, 117, 130, 131, 144, 158, 160$ et 171 . Colonne BP21, 50 m, 0,32 mm, 0,25 μm température de four 60 °C pendant 1min, puis programmation à 2 °C/min jusqu'à 220 °C. température de l'injecteur : 250 °C. 1. glyoxal ; 2. méthylglyoxal ; 3. diacétyle ; 4. pentane-2,3-dione ; 5. hexane-2,3-dione (étalon interne) ; 6. phénylgyoxal (non étudié dans cette méthode).

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. Identi®cation 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).
10. Gilles de Revel et Alain Bertrand analyse des composés α -dicarbonylés du vinaprès dérivation par le 1,2-diaminobenzène OIV FV 1275