

## RESOLUTION OIV/OENO 382D/2010

### **ACTUALISATION DU RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLES – Analyse des composés $\alpha$ -dicarbonylés des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole par chromatographie en phase gazeuse après dérivation par le 1,2-diaminobenzène**

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 $\alpha$ -dicarbonylés DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLE PAR chromatographie en phase gazeuse après dérivation par le 1,2-diaminobenzène**

Méthode de type IV

## **1. Introduction**

Les principaux composés  $\alpha$ -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 :  $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CO}-\text{CH}_3$

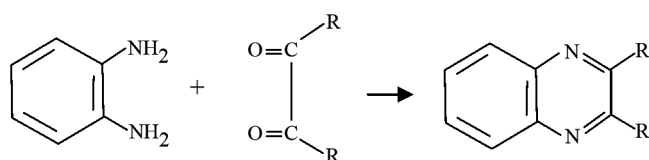
Figure 1. Les principaux composés  $\alpha$ -dicarbonylés du vin (l'hexane-2,3-dione n'est pas naturellement présente dans le vin mais elle est utilisée comme étalon interne). Les composés dicarbonylés sont importants en raison de leur impact sensoriel.

## 2. Domaine d'application

Cette méthode s'applique aux boissons spiritueuses d'origine vitivincicole pour des teneurs en composés carbonylés compris entre 0,05 mg/L à 20 mg/L.

## 3. Principe

La méthode est basée sur la formation de dérivés de type quinoxaline à partir des composés  $\alpha$ -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 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. Diacétyl (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 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.

## 5. Appareillage

- 5.1. Chromatographe 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 (par exemple Carbowax 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 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 (5.6)

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/1 (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. Analyse

### 7.1.1. Extraction des quinoxalines

- Le milieu réactionnel préparé en 7, est amené à pH 2 à l'aide de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M (4.6) ;
- Extraire à 2 reprises par 5 ml de dichlorométhane (4.7) par agitation magnétique durant 5 minutes ;
- Décantier la phase inférieure à chaque reprise ;
- Mélanger les deux phases de solvant ;
- Sécher sur 1 g environ de sulfate de sodium anhydre (4.8) ;
- Décantier.

### 7.1.2. 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 :* Un détecteur spécifique des composés azotés peut être utilisé.

- *Colonne.* La colonne est une BP21 (SGE, 50 m x 0,32 mm x 0,25 µm).
- *Températures.* Les température de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250 °C et 280 °C ; celle du four est maintenue à 60 °C pendant 1min, puis programmée à raison de 2 °C/min jusqu'à 220 °C et l'isotherme final 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.

### 7.1.3. Analyse des quinoxalines formées

- *Séparation.* Le chromatogramme des dérivés par 1,2-diaminobenzène d'une boisson spiritueuse selon la méthode de sélection d'ions (SIM) est montré à la Figure 3.
- *Identification des pics.* L'utilisation de la GC-MS a permis d'identifier les composés dicarboxylés dérivés d'une eau-de-vie de 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 dicarboxylés dérivés obtenus.
- *Dosage.* La détermination quantitative des composés dicarboxylés 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  $171$ .

### 7.1.4. 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 dicarboxylés ;
- *Taux de récupération.* Les quantités ajoutées à un vin ont été récupérées avec un écart par rapport à la valeur attendue inférieur à 6% ;
- *Linéarité.* Des corrélations linéaires ont été obtenues dans des domaines de concentrations compris entre 0,05 à 20 mg/l.
- *Limite de détection.* La limite de détection de la plupart des produits dicarboxylés

dérivés 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)<br>75 (10.4), 131 (9.4)                                  |
| Méthylglyoxal       | 2-Méthylquinoxaline         | 144 (100), 117 (77.8), 76 (40.5), 77 (23.3)<br>50 (21.9), 75 (11.3), 145 (10.3)                      |
| Diacétyl            | 2,3-Diméthylquinoxaline     | 117 (100), 158 (75.6), 76 (32.3), 77 (23.1)<br>50 (18.3), 75 (10.4)                                  |
| Pentane-2,3-dione   | 2-Ethyl-3-méthylquinoxaline | 171 (100), 172 (98), 130 (34.1), 75 (33.3),<br>77 (21), 50 (19.4), 144 (19), 143 (14.1),<br>103 (14) |
| Hexane-2,3-dione    | 2,3-Diéthylquinoxaline      | 158 (100), 171 (20.1), 76 (13.7),<br>77 (12.8), 159 (11.4), 157 (10.8), 50 (8.1)                     |

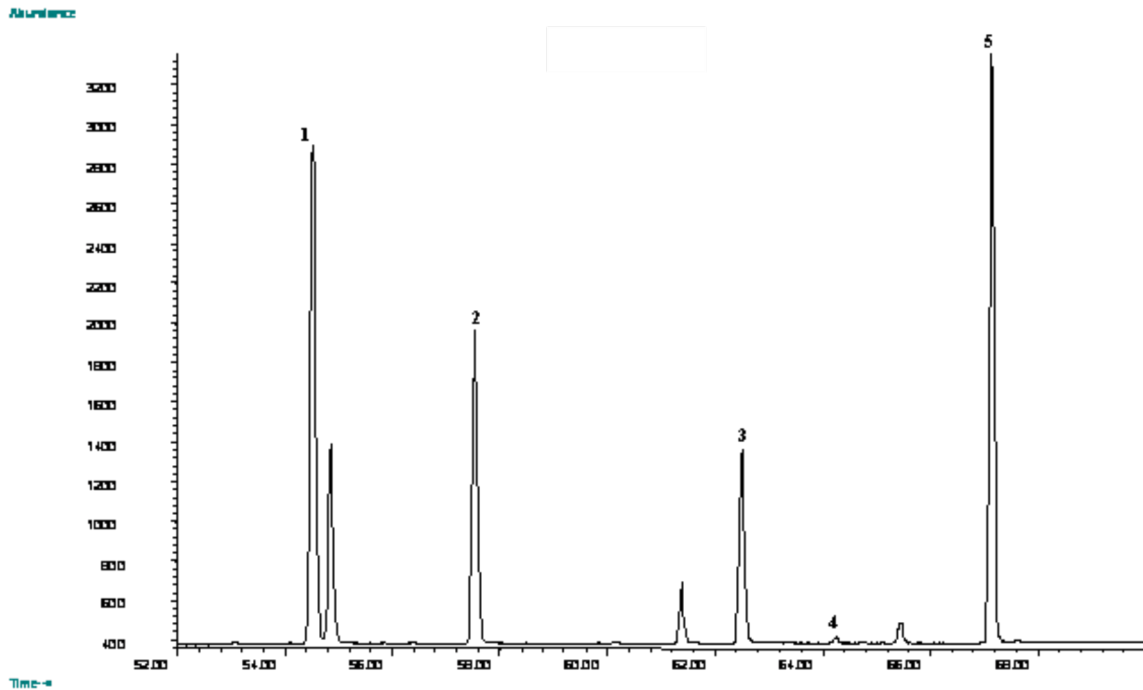


Figure 3. Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait des composés dicarbonylés dérivés par le 1,2-diaminobenzène d'une eau-de-vie de vin, détectés en spectrométrie de masse en choisissant les ions  $m/z = 76, 77, 103, 117, 130, 131, 144, 158, 160$  et  $171$ . Colonne BP21, 50 m X 0,32mm 0,25  $\mu\text{m}$ . 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 dosé par cette méthode).

## 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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. Identifi@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).