

## RESOLUTION OIV/OENO 386A/2010

### METHODE DE DETERMINATION DES COMPOSES $\alpha$ -DICARBONYLES DU VIN PAR HPLC 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 $\alpha$ -dicarbonylés du vin par HPLC après dérivation par le 1,2-diaminobenzène

#### 1. Introduction

Les principaux composés  $\alpha$ -dicarbonylés du vin (Figure 1) sont : glyoxal, méthylglyoxal, diacétyle et pentane-2,3-dione, seules les  $\alpha$ -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  $\alpha$ -dicarbonylés du vin, (l'hexane-2,3-dione n'est pas naturellement présente dans le vin mais elle est utilisée comme étalon interne).

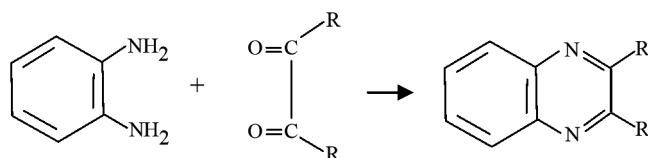
Les composés dicarbonylés sont importants dans le vin pour des raisons différentes : impact sensoriel, réactivité avec d'autres composants du vin ou possibles effets microbiologiques.

## 2. Domaine d'application

Cette méthode s'applique à tous types de vins (blancs, rouges, sucrés ou fortifiés), pour des 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  $\alpha$ -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 directement par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et détection par absorptiométrie 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. 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 (par exemple microfiltrée et de résistivité de 18,2 M $\Omega$ )

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 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. Chromatographie en phase liquide à haute performance avec détection par absorptiométrie 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 microseringues.

## 6. Préparation de l'échantillon

Aucune préparation spécifique n'est requise

## 7. Mode opératoire

Placer 10 ml de vin dans un flacon de 30 ml (5.7.)

Amener à pH 8 sous agitation, avec de l'hydroxyde de sodium 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. Optimisation et conditions analytiques

Le rendement de la réaction des composés dicarbonylés avec le 1,2-diaminobenzène est optimal à pH 8. Des solutions de composés dicarbonylés ont été dérivés à 25, 40 ou 60 °C puis analysés par HPLC selon le protocole décrit au point 7.2 à des moments différents (tableau 1). Les dicétones nécessitent beaucoup plus de temps de réaction et une température de réaction plus élevée. La réaction est plus lente avec les molécules à plus longue chaîne (la pentane-2,3-dione et l'hexane-2,3-dione).

Par ailleurs, aucune interférence du SO<sub>2</sub> avec la formation des quinoxalines n'a été notée lors de l'étude de la méthode.

Tableau 1. Effet du temps de réaction et de la température sur le rendement de dérivés par le 1,2-diaminobenzène du glyoxal, du diacétyle et de l'hexane-2,3-dione

|         |                  | Temps de réaction    |    |     |
|---------|------------------|----------------------|----|-----|
|         |                  | 1h                   | 2h | 3h  |
|         | Température (°C) | Taux de récupération |    |     |
| Glyoxal | 25               | 92                   | 93 | 94  |
|         | 40               | 95                   | 97 | 98  |
|         | 60               | 96                   | 98 | 100 |

|                  |    |    |     |     |
|------------------|----|----|-----|-----|
| Diacétyle        | 25 | 23 | 77  | 87  |
|                  | 40 | 64 | 89  | 94  |
|                  | 60 | 85 | 100 | 100 |
| Hexane-2,3-dione | 25 | 17 | 67  | 79  |
|                  | 40 | 55 | 79  | 88  |
|                  | 60 | 69 | 93  | 100 |

## 7.2. Analyse par HPLC

- *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, le programme d'élution est présenté dans le tableau Tableau 2

Tableau 2. Programme d'élution de l'analyse par HPLC

| Temps en minutes | Solvant A | Solvant B |
|------------------|-----------|-----------|
| 0                | 80        | 20        |
| 8                | 50        | 50        |
| 26               | 25        | 75        |
| 30               | 0         | 100       |
| 32               | 0         | 100       |
| 40               | 100       | 0         |

Le débit étant de 0,6 ml/min

- *Séparation.* Le chromatogramme obtenu par HPLC est indiqué dans la Figure 3.
- *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 tous les vins.

### 7.2.1. Caractéristiques de la méthode par HPLC

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 a été calculée à partir de 10 analyses du même vin (tableau 3).

Tableau 3. Étude de répétabilité et performance de la méthode

|                   | Moyenne* | Ecart type | CV (%) |
|-------------------|----------|------------|--------|
| Vin blanc         |          |            |        |
| Glyoxal           | 4,379    | 0,101      | 2,31   |
| Méthylglyoxal     | 2,619    | 0,089      | 3,43   |
| Diacétyle         | 5,014    | 0,181      | 3,62   |
| Pentane-2,3-dione | 2,307    | 0,097      | 4,21   |
| Vin rouge         |          |            |        |
| Glyoxal           | 2,211    | 0,227      | 10,30  |
| Méthylglyoxal     | 1,034    | 0,102      | 9,91   |

|                   |       |       |       |
|-------------------|-------|-------|-------|
| Diacétyle         | 1,854 | 0,046 | 2,49  |
| Pentane-2,3-dione | 0,698 | 0,091 | 13,09 |

\*Résultats en mg/l à partir de 10 analyses du même vin.

- *Linéarité.* La linéarité de la méthode a été testée en utilisant des solutions standards (solution hydroalcoolique à 12 % vol. comme matrice) (Tableau 4). L'analyse quantitative des ajouts de composés dicarbonylés a montré que la méthode est linéaire pour les quatre composés avec une précision satisfaisante.

Tableau 4. Étude de la linéarité et essais de récupération avec des solutions standard (eau-éthanol 12 % v/v) valeur du coefficient de corrélation

| Glyoxal   | Méthylglyoxal | Diacétyle | Pentane-2,3-dione |
|-----------|---------------|-----------|-------------------|
| R = 0,992 | R = 0,997     | R = 0,999 | R = 0,999         |

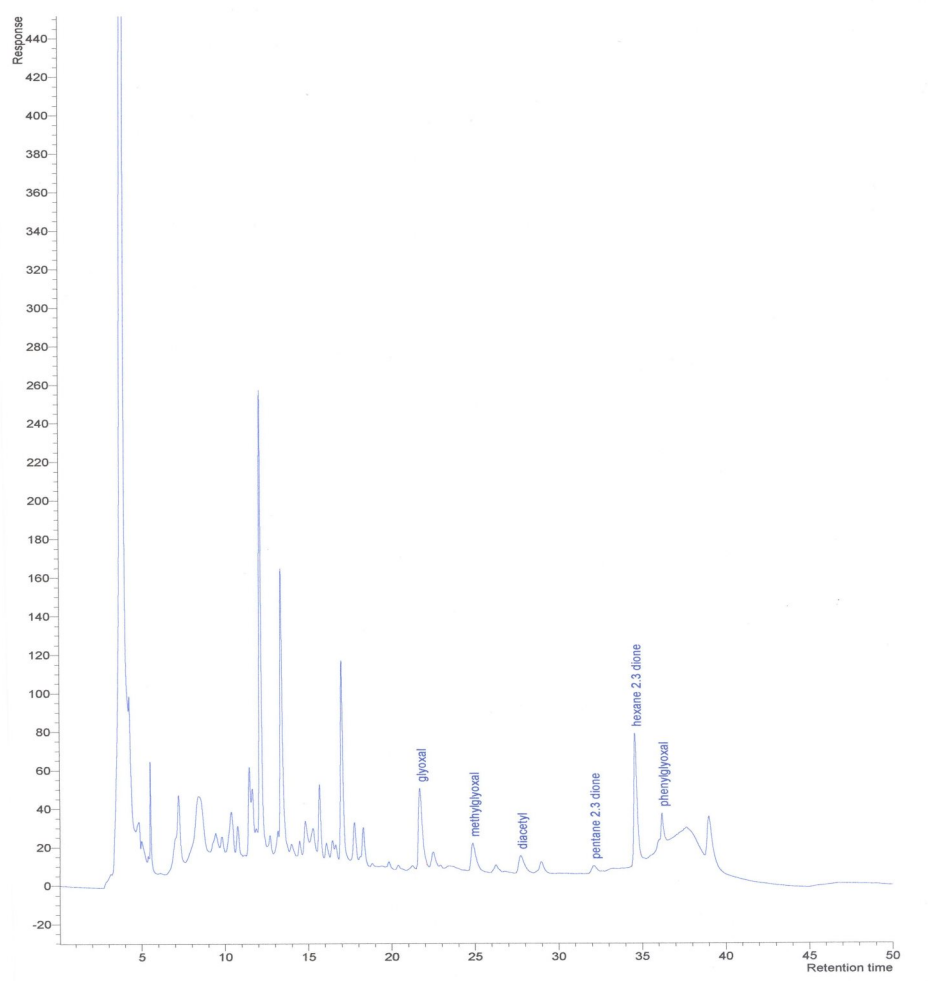
- *Le taux de récupération* des ajouts effectués en vins rouges et blancs ont démontré la bonne performance de la méthode Compris entre 92 % et 116 % pour les valeur extrêmes
- *La limite de quantification* des composés dicarbonylés est très basse, les meilleurs résultats étant obtenus avec le diacétyle dont la limite de détection est 10 fois plus faible que celle des autres composés (tableau 5).

Tableau 5. Performance de la méthode par HPLC pour la quantification des composés dicarbonylés

| Limites       | détection <sup>a</sup> | détermination <sup>a</sup> | quantification <sup>a</sup> |
|---------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Glyoxal       | 0,015                  | 0,020                      | 0,028                       |
| Méthylglyoxal | 0,015                  | 0,020                      | 0,027                       |
| Diacétyle     | 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 d'un vin blanc, détectés en UV à 313 nm Colonne Sperisorb ODS 250 mm x 4,6 mm x 5 µm.*

## 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. 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).
10. Gilles de Revel et Alain Bertrand analyse des composés  $\alpha$ -dicarbonyles du vin
11. après dérivation par le 1,2-diaminobenzène OIV FV 1275