

## RÉSOLUTION OENO 11/2007

### **DETERMINATION DU 3-METHOXYPROPANE-1,2-DIOL ET DES DIGLYCEROLS CYCLIQUES (DERIVES DE GLYCEROL TECHNIQUE) DANS LE VIN PAR CG-SM - DESCRIPTION DE LA METHODE ET DE L'ETUDE COLLABORATIVE**

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 et d'appréciation des vins,

DECIDE de compléter l'Annexe A du *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*, par la méthode de type II suivante :

Titre	Type de méthode
Détermination du 3-méthoxypropane-1,2-diol et des diglycérols cycliques (dérivés de glycérol technique) dans le vin par CG-SM - Description de la méthode et de l'étude collaborative -	II

## 1. Introduction

C'est une méthode validée à l'échelon international pour la détermination du 3-méthoxypropane-1,2-diol (3-MPD) et des diglycérols cycliques (DC) - ces deux produits étant reconnus comme des impuretés du glycérol technique - dans différents types de vin. Il est avéré que le glycérol produit par la transestérification de triglycérides végétaux et animaux avec du méthanol contient une quantité importante de 3-MPD. La synthèse de glycérol à partir de produits pétrochimiques génère des impuretés de DC. L'une des méthodes publiées [[i], [ii], [iii]] a été adoptée, modifiée et testée dans le cadre d'une étude collaborative. Cette méthode optimisée a fait l'objet d'une étude collaborative [[iv]] dont la conception et l'évaluation sont inspirées de la Résolution 8/2000 O.I.V. « Protocole de validation de méthodes analytiques ».

## 2. Champ d'application

La méthode décrite convient à la détermination de 3-MPD et de 6 diglycérols cycliques (cis-, trans-2,6-bis(hydroxyméthyl)-1,4-dioxane ; cis-, trans-2,5-bis(hydroxyméthyl)-1,4-dioxane ; cis-, trans-2-hydroxyméthyl-6-hydroxy-1,4-dioxépane) dans des vins blancs, rouges, doux et secs. L'étude décrite couvre des plages de concentration respectives de 0,1 à 0,8 mg/L pour le 3-MPD et de 0,5 à 1,5 mg/L pour les DC.

## 3. Définitions

3-MPD	3-méthoxypropane-1,2-diol
ANVA	Analyse de variance
C	Concentration
DC	Diglycérols cycliques
CG-SM	Chromatographie en phase gazeuse – Spectrométrie de masse
H <sub>2</sub>	Hydrogène
EI	Étalon interne
m/z	Rapport masse/charge
NM	Niveau de calibrage matriciel
S0	Dilution standard 1 000 ng/µL
S1	Dilution standard 100 ng/µL
S2	Dilution standard 10 ng/µL

## 4. Principe

Les analytes et l'étalon interne sont relargués par ajout de  $K_2CO_3$ , puis extraits à l'aide d'éther diéthylique. Les extraits sont analysés directement par CG-SM sur une colonne polaire. La détection est ensuite effectuée en mode fragmentométrique.

## 5. Réactifs et appareillages

### 5.1. Produits chimiques

- 5.1.1.  $K_2CO_3$  p.A.
- 5.1.2. Éther diéthylique Uvasol pour spectroscopie
- 5.1.3. Tamis moléculaire (diam. : 2 mm, dim. pore : 0,5 nm)
- 5.1.4. Ethanol (absolu)

### 5.2. Produits

- 5.2.1. Mélange diglycérol cyclique (6 composants) - Solvay Alkali GmbH <sup>[1]</sup>, 89,3 %  
cis-, trans-2,6-bis(hydroxyméthyl) 1,4-dioxane ; cis-, trans-2,5-bis(hydroxyméthyl) 1,4-dioxane ; cis-, trans-2,-hydroxyméthyl-6-hydroxy-1,4-dioxépane
- 5.2.2. 3-méthoxypropane-1,2-diol (3-MPD) 98 % (CAS 623-39-2)
- 5.2.3. butane-1,4-diol-1,1,2,2,3,3,4,4-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> 98 % (CAS 74829-49-5)

### 5.3. Préparation des solutions standard

#### 5.3.1. Solutions mères S0

Peser précisément 10,0 mg ± 0,05 mg de chaque substance standard (11,2 mg pour les DC, correspondant à une pureté de 89,3 %) et transvaser chaque volume dans une fiole jaugée de 10 mL (une pour chaque substance). Ajouter exactement 10 mL d'éthanol et mélanger vigoureusement. La concentration de cette solution est de 1 000 ng/µL.

#### 5.3.2. Solutions préparées S1

Transvaser volumétriquement 1 000 µL de la solution mère S0 (5.3.1) dans une fiole jaugée de 10 mL, diluer avec de l'éthanol, boucher hermétiquement la fiole et la renverser pour mélanger. La concentration de cette solution est de 100 ng/µL.

#### 5.3.3. Solutions préparées S2

Transvaser volumétriquement 100 µL de la solution mère S0 (5.3.1) dans une fiole jaugée de 10 mL, diluer avec de l'éthanol, boucher hermétiquement la fiole et la renverser pour mélanger. La concentration de cette solution est de 10 ng/µL.

Présentation des solutions standard requises :

Mélange CD (6 composants)

Solution	Concentration	
S0	1 000	ng/µL
S1	100	ng/µL

3-méthoxypropane-1,2-diol (3-MPD)

Solution	Concentration	
S0	1 000	ng/µL
S1	100	ng/µL
S2	10	ng/µL

butane-1,4-diol-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> (étalon interne EI)

Solution	Concentration	
S0	1 000	ng/µL
S1	100	ng/µL

## 5.4. Préparation de la courbe de calibrage matriciel

Des solutions de calibrage sont préparées, par rapport à la matrice, dans un vin non contaminé. Il faut d'abord analyser ce vin afin de s'assurer qu'il n'est pas contaminé par du 3-MPD ou des DC. Si les concentrations d'analytes dans l'échantillon sont hors du champ de la courbe de calibrage, des doses supplémentaires doivent être préparées.

Un blanc doit en outre être inséré de manière à vérifier que l'étalon interne n'interfère pas avec l'un ou l'autre des composants du vin.

**Tableau 1. Plan de pipetage pour le calibrage matriciel**

Niveau de calibrage matriciel		Ajout $\mu$ l	Volume de vin		C vin	C vin
			ml	$\mu$ g/L	mg/L	
Blanc	EI	-	10	0	0	
	3-MPD	-				
	DC	-				
NM0	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	-				
	DC	-				
NM1	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	100	S2		100	0,10
	DC	50	S1		500	0,50
NM2	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	25	S1		250	0,25
	DC	100	S1		1 000	1,00
NM3	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	50	S1		500	0,50
	DC	20	S0		2 000	2,00

NM4	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	100	S1		1 000	1,00
	DC	30	S0		3 000	3,00
NM5	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	200	S1		2 000	2,00
	DC	40	S0		4 000	4,00

## 6. Appareillage

- 6.1. Balance d'analyses. Précision  $\pm 0,0001$  g.
- 6.2. Centrifugeuse de laboratoire (minimum 4 000 tr/mn).
- 6.3. Chromatographe en phase gazeuse. Avec détecteur à spectrométrie de masse, injecteur split-splitless.
- 6.4. Diverses pipettes de précision et fioles jaugées.
- 6.5. Pipettes Pasteur.
- 6.6. Flacons de centrifugation 40 mL.
- 6.7. Flacons CG (1,5 –2,0 mL).
- 6.8. Thermostat.
- 6.9. Agitateur secoueur.

## 7. Échantillonnage

Prévoir des échantillons de vin de taille suffisante pour l'analyse. Le volume requis pour un échantillon d'essai est de 10 mL. Le vin employé pour la préparation du calibrage matriciel (5.4) doit être exempt d'analytes.

## 8. Procédure

### 8.1. Extraction

Ajouter 100  $\mu$ L de solution standard S1 (5.3.2) à 10 mL de vin dans un flacon de

centrifugation adapté – ex. : 40 mL (cela correspond à une concentration de 1 mg/L de butane-1,4-diol-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>). Ajouter précautionneusement 10 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et mélanger. Il convient d'observer une grande prudence durant cet ajout, car le dégagement du CO<sub>2</sub> produit de la chaleur. Refroidir la solution dans un bain-marie à environ 20 °C, puis ajouter 1 mL d'éther diéthylique. Homogénéiser le mélange pendant 5 minutes au moyen d'un agitateur secoueur vertical. Centrifuger les flacons à 4 000 tr/mn pendant 5 minutes. Pour une élimination optimale de la phase organique, l'extrait peut être partiellement transvasé dans un flacon de diamètre plus petit. À l'aide d'une pipette Pasteur, transvaser la phase organique supérieure, composée d'éther diéthylique et d'éthanol, dans un flacon CG. Ajouter environ 120 mg de tamis moléculaire dans le flacon. Boucher le flacon, laisser reposer pendant environ 2 heures et secouer énergiquement de temps en temps. Le surnageant incolore est transvasé dans un second flacon CG pour l'analyse CG-SM.

## 8.2. Analyse CG-SM

Les paramètres spécifiques de l'analyse CG-SM sont donnés ci-dessous. D'autres systèmes peuvent toutefois être employés dans la mesure où ils sont en mesure de produire une performance chromatographique analogue et une sensibilité adéquate. Le système chromatographique doit être capable de séparer l'étalon interne du phénylethanol, susceptible de provoquer des interférences.

### Conditions CG typiques

Chromatographe en phase gazeuse : HP 5890 ou équivalent.

Colonne DBwax (J&W) 60 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de film 0,25 µm, précolonne de rétention capillaire 2 m – dimensions identiques ou équivalentes.

Gaz vecteur : H<sub>2</sub>.

Flux – Pression de 60 k Pa en tête de colonne

Programme de température :

90° C, 2 mn, rampe à 10°C/mn jusqu'à 165° C, maintien pendant 6 mn, rampe à 4° C/mn jusqu'à 250°C, maintien pendant 5 mn.

Température d'injection : 250° C ; volume injecté ; 2 µl, mode splitless durant 90 s.

### Conditions SM spécifiques

Spectromètre de masse : Finnigan SSQ 710 ou équivalent.

Ligne de transfert : 280° C.

Source : 150° C.

Détection SM :

fenêtre 1 : 0-25 mn :

14,3 mn 3-MPD :  $m/z$  75,  $m/z$  61

16,7 mn EI :  $m/z$  78,  $m/z$  61

Le temps d'acquisition pour chaque masse est de 250  $\mu$ s (temps de maintien).

Vérifier pour  $m/z$  91 la séparation du pic de l'étalon interne (EI) de celui du phénylethanol, qui produit aussi un fragment  $m/z$  78.

fenêtre 2 : 25-40 mn :

32-34,5 mn DC :  $m/z$  57,  $m/z$  117

Le temps d'acquisition pour chaque masse est de 250  $\mu$ s (temps de maintien).

Il a été observé que l'analyte pouvait dégrader la colonne chromatographique. En particulier, l'injection du mélange de DC à haut point d'ébullition est suspecté de provoquer des dommages irréversibles. Il convient d'éviter les injections de solutions standard de référence ; l'analyse doit être limitée aux solutions relarguées, avec de faibles concentrations d'analytes. De plus, il est recommandé de prévoir une précolonne de 1-2 m afin de protéger la colonne d'analyse. Quoi qu'il en soit, la colonne d'analyse doit être considérée comme un consommable et, de ce fait, remplacée régulièrement.

## 9. Évaluation

### 9.1. Identification

Noter le temps de rétention relatif de chaque analyte par rapport à l'EI. Calculer le temps de rétention relatif moyen des analytes dans les solutions standard de calibrage. Le temps de rétention relatif de l'analyte doit être identique à celui de l'étalon, avec une marge de  $\pm 0,5\%$ . Comme critère de confirmation, un rapport ionique peut être calculé pour chaque analyte en mode fragmentométrique. Ce rapport est de 117/57 pour les DC, de 75/61 pour 3-MPD et de 78/61 pour l'EI. Le rapport doit se situer à  $\pm 20\%$  de celui observé pour l'échantillon enrichi. Il est également possible d'obtenir confirmation de l'identité des substances en effectuant le balayage complet des ions.(scan).

### 9.2. Quantification

La quantification se fait au moyen de la courbe de calibrage matriciel dûment préparée selon la section appropriée. Les surfaces analyte/EI sont corrélées par régression linéaire par rapport à la concentration de l'analyte. La quantification des DC se fait en additionnant les surfaces des 6 pics et en calculant la teneur totale, de

manière à autoriser des distributions des six CD caractéristiques autres que dans la solution standard. Les valeurs m/z suivantes sont utilisées pour la quantification :

3-MPD : m/z 75

EI : m/z 78

DC : m/z 117

### **9.3. Expression des résultats**

Les résultats doivent être exprimés en mg/L pour 3-MPD et DC, avec deux décimales (ex. : 0,85 mg/L).

### **9.4. Limite de détection et limite de quantification**

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) dépendent des conditions de mesure individuelles des analyses chimiques qui sont à déterminer par les utilisateurs de la méthode.

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été évaluées à l'aide des instruments et des conditions mentionnés ci dessus (§. 8) en suivant les instructions mentionnées dans la résolution OENO 7-2000 (AS1-10-LIMDET) "Estimation de la Limite de Détection et de la limite de Quantification d'une Méthode d'Analyse". A partir du modèle de "Schéma logique pour la prise de décisions" numéro 3, l'approche graphique doit être appliquée en suivant les conditions stipulées au paragraphe 4.2.2. Pour ceci, on choisit une partie du chromatogramme encadrant le pic et correspondant à 10 fois la largeur du pic à mi-hauteur ( $w_{1/2}$ ). Deux lignes parallèles sont tracées encadrant l'amplitude maximale de la fenêtre du signal (bruit de fond). La distance entre ces deux lignes ( $h_{max}$ ), multipliée par 3 pour la LD, et par 10 pour la LQ et finalement convertie en unités de concentration en utilisant le facteur de réponse de la substance donne les valeurs recherchées (LD et LQ).

#### 3-MPD:

LD: 0,02 mg/l

LQ: 0,06 mg/l

#### DC (sum):

LD: 0,08 mg/l

LQ: 0,25 mg/l

(Note: Etant donné que DC correspond à un mélange de 6 composés isolés avec le même facteur réponse - du fait de leur similitude chimique - et avec un  $h_{max}$  constant dans la partie correspondante du chromatogramme, la LD et la LQ pour chaque

composé isolé représentent un sixième des valeurs citées ci-dessus.)

## 10. Fidélité (validation interlaboratoire)

Onze laboratoires ont participé à l'étude collaborative. Ces laboratoires participants possèdent tous une expérience avérée dans l'analyse des dérivés. Ils ont tous pris part à l'essai préparatoire.

Il est apparu que la répétabilité ( $r$ ) et la reproductibilité ( $R$ ), ainsi que les écarts-types respectifs ( $S_r$  et  $S_R$ ), étaient fortement corrélés, sur le plan statistique, avec la concentration des analytes (ANNEXE : Schémas 1 et 2),  $r$  avec une probabilité supérieure à 95 % et  $R$  avec une probabilité supérieure à 99 % pour chacun des analytes en utilisant le modèle de régression linéaire.

Les paramètres de performance peuvent se calculer ainsi :

### 3-MPD

$$S_r = 0,060 \quad x = \text{concentration de 3-MPD [mg/L]}$$

$$S_R = 0,257 x$$

$$r = 0,169 x$$

$$R = 0,720 x$$

### DC

$$S_r = 0,082 \quad x = \text{concentration de x= concentration de 3-MPD [mg/L]}$$

$$S_R = 0,092 x + 0,070$$

$$r = 0,230 x$$

$$\text{concentration de DC [mg/L]}$$

$$R = 0,257 x + 0,197$$

## 11. ANNEXE (Étude interlaboratoire)

### 11.1. Participants

Onze laboratoires internationaux ont participé à l'étude collaborative (5). Ces laboratoires participants possèdent tous une expérience avérée dans l'analyse des dérivés. Ils ont tous pris part à l'essai préparatoire :

CSL, York, Royaume-Uni

Unione Italiana Vini, Vérone, Italie

BfR, Berlin, Allemagne

BLGL, Würzburg, Allemagne  
 Istituto Sperimentale per l'enologia, Asti, Italie  
 LUA, Speyer, Allemagne  
 Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach, Allemagne  
 CLUA, Münster, Germany  
 Kantonales Laboratorium, Füllinsdorf, Suisse  
 LUA, Coblenza, Allemagne  
 ISMAA, S. Michele all'Adige, Italie

## 11.2. Échantillons

En novembre 2002, les laboratoires participants se sont vu remettre onze échantillons de vin, consistant en cinq jeux d'échantillons en double aveugle et en un autre matériau d'essai. Des vins blancs secs, des vins rouges secs et un vin rouge doux faisaient fonction de matériau d'essai. Les échantillons ont préalablement été soumis à des essais d'homogénéité ([v]).

## 11.3. Analyse des données

Une analyse statistique a été conduite conformément au « Protocole de conception, de conduite et d'interprétation des études de performance-méthode » ([vi]) sur un modèle en double aveugle.

1. La détermination des valeurs aberrantes a été effectuée à l'aide des tests de Cochran, Grubbs unilatéral et Grubbs bilatéral.
2. L'analyse statistique a été conduite afin d'obtenir des données de répétabilité et de reproductibilité.
3. Les valeurs de Horrat ont été calculées.

Tableau 2. Résultats pour 3-MPD

	ÉCHANTILLON A Vin blanc	ÉCHANTILLON B Vin rouge <sup>a</sup>	ÉCHANTILLON C Vin blanc	ÉCHANTILLON F Vin rouge doux	ÉCHANTILLON G Vin blanc
Moyenne mg/L	0,30	0,145	0,25	0,48	0,73

<b>mg/L enrichi</b>	0,30	0,12	-	-	0,80
Récupération %	100	121	-	-	91
n	10	10 <sup>a</sup>	10	10	10
nc	1	1 <sup>a</sup>	1	1	1
Résultats aberrants	2	0	0	1	1
n1	7	9 <sup>a</sup>	9	8	8
r	0,03	-	0,05	0,08	0,13
sr	0,01	-	0,02	0,03	0,05
RSD <sub>r</sub> %	3,20	-	7,20	5,80	6,57
<b>Hor</b>	<b>0,30</b>	<b>-</b>	<b>0,60</b>	<b>0,50</b>	<b>0,59</b>
R	0,13	0,13	0,15	0,31	0,59
sR	0,05	0,05	0,05	0,11	0,21
RSD <sub>r</sub> %	15,50	32,67	21,20	22,70	28,91
<b>HoR</b>	<b>0,80</b>	<b>1,53</b>	<b>1,10</b>	<b>1,30</b>	<b>1,72</b>

<sup>a</sup> Échantillon d'essai simple ; n, nc et n1 sont des résultats simples.

Moyenne : moyenne arithmétique des données employées dans l'analyse statistique

n : nombre total de groupes de données soumis

nc : nombre de résultats (laboratoires) exclus pour non conformité

r. aberrants : nombre de résultats (laboratoires) exclus après avoir été déterminés aberrants en vertu des essais Cochran ou Grubbs

n1 : nombre de résultats (laboratoires) retenus dans l'analyse statistique

S<sub>r</sub> : écart-type de la répétabilité

RSD<sub>r</sub> : écart-type relatif de la répétabilité (S<sub>r</sub> x 100/moyenne)

r : répétabilité (2,8 x S<sub>r</sub>)

$Ho_r$  : la valeur Horrat de répétabilité est la valeur  $RSD_r$  observée, divisée par la valeur  $RSD_r$  estimée par l'équation Horwitz sur l'hypothèse  $r = 0,66R$

$R$  : reproductibilité (entre l'écart laboratoire) ( $2,8 \times S_R$ )

$S_R$  : écart-type de la reproductibilité

$RSD_R$  : écart-type relatif de la reproductibilité ( $S_R \times 100 / \text{moyenne}$ )

$Ho_R$  : la valeur Horrat de reproductibilité est la valeur  $RSD_R$  observée, divisée par la valeur  $RSD_R$  calculée par l'équation Horwitz

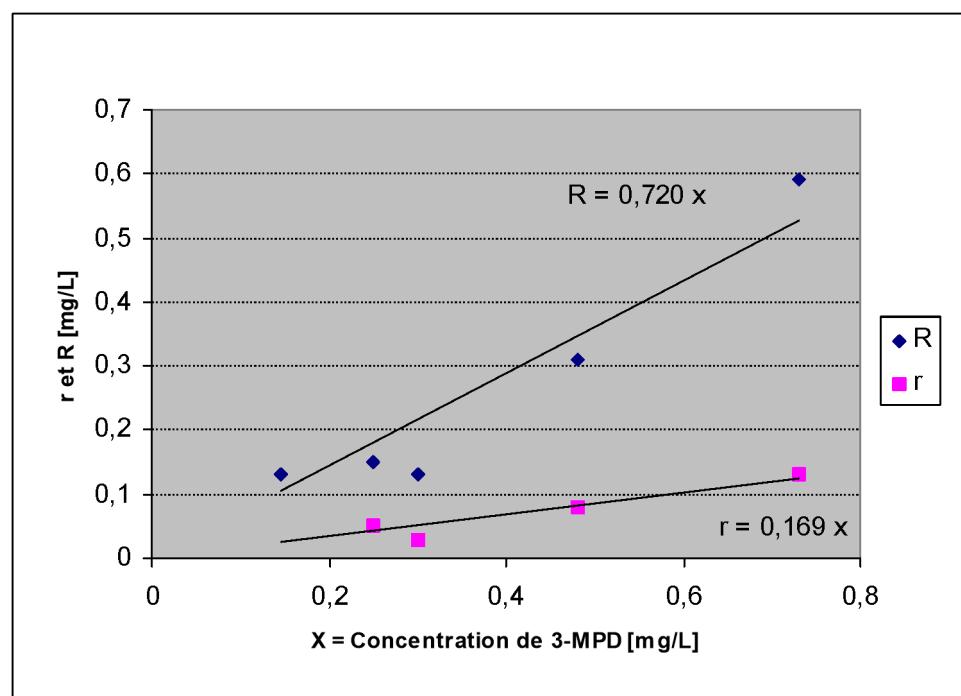


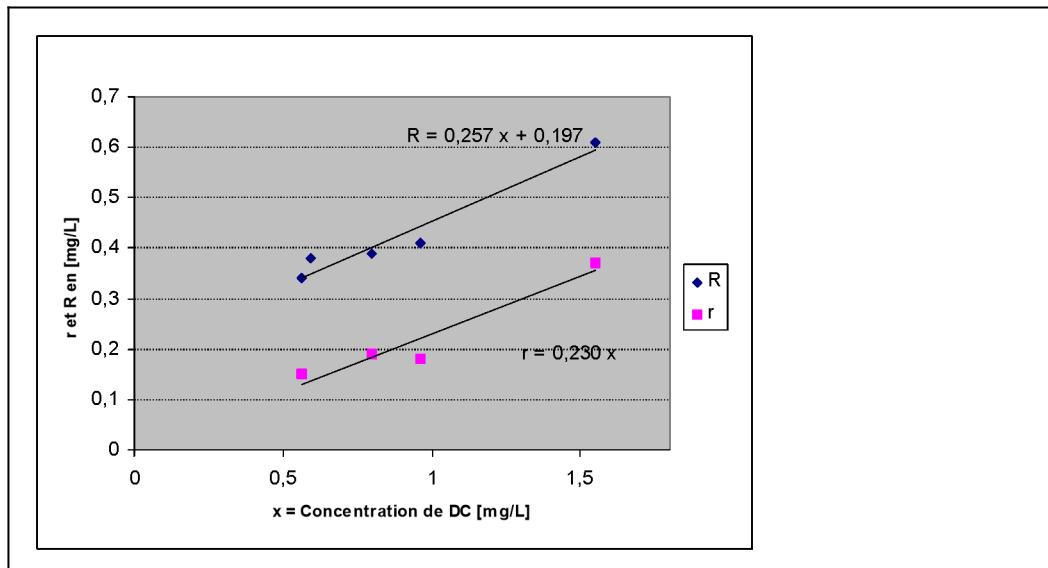
Schéma 1. Corrélation entre la concentration de 3-MPD et  $r$  et  $R$ .

Tableau 3. Résultats pour les diglycérols cycliques

	ÉCHANTILLON A Vin blanc	ÉCHANTILLON B Vin rouge <sup>a</sup>	ÉCHANTILLON D Vin rouge	ÉCHANTILLON F Vin rouge doux	ÉCHANTILLON G Vin blanc
Moyenne mg/L	1,55	0,593	0,80	0,96	0,56

<b>mg/L enrichi</b>	1,50	0,53		0,50	
Récupération %	103	113		112	
n	11	11 <sup>a</sup>	11	11	11
nc	0	0	0	0	0
Résultats aberrants	2	0	1	2	1
n1	9	11 <sup>a</sup>	10	9	10
r	0,37	-	0,19	0,18	0,15
sr	0,13	-	0,07	0,07	0,05
RSDr %	8,50	-	8,60	6,70	9,30
<b>Hor</b>	<b>0,90</b>	<b>-</b>	<b>0,80</b>	<b>0,60</b>	<b>0,80</b>
R	0,61	0,379	0,39	0,41	0,34
sR	0,22	0,135	0,13	0,15	0,12
RSDR %	14,00	22,827	17,30	15,20	21,50
<b>HoR</b>	<b>0,90</b>	<b>1,319</b>	<b>1,00</b>	<b>0,90</b>	<b>1,20</b>

<sup>a</sup> Échantillon d'essai simple ; n et nc sont des résultats simples.



*Schéma 2. Corrélation entre la concentration de DC et r et R.*

<sup>[1]</sup> Solvay Alkali GmbH ne commercialise plus de mélanges standard ; des solutions de ce mélange peuvent être obtenues auprès de BfR. Federal Institute for Risk Assessment, Thielallee 88-92, D-14195 Berlin. [www.bfr.bund.de](http://www.bfr.bund.de). poststelle@bfr.bund.de

## Bibliographie

1. (1) Lampe, U., Kreisel, A., Burkhard, A., Bebiolka, H., Brzezina, T., Dunkel, K. (1997)

Zum Nachweis eines Glycerinzusatzes zu Wein  
Deutsche Lebensmittelrundschau 93(4), 103-110

2. (2) Otteneder, H., Zimmer, M., Schaab, J. (1999)

Nachweis des Glycerinzusatzes  
Deutsche Lebensmittel Rundschau 95, 172-175

3. ([iii]) Bononi, M., Favale, C., Lubian, E., Tateo F. (2001)

A new method for the identification of cyclic diglycerols in wine  
J. Int. Sci. Vigne Vin. 35, 225-229

4. (4) Fauhl C, Wittkowski R, Lofthouse J, Hird S, Brereton P, Versini G, Lees M, Guillou C (2004),

Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Determination of 3-Methoxy-1,2-Propanediol and Cyclic Diglycerols, By-Products of Technical Glycerol, in Wine: Interlaboratory Study,

Journal of AOAC International 87: 1179-1188

5. (5) Thompson, M. and Wood, R. (1993)

International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories

J AOAC Int 76, 926-940

6. (6) Horwitz ,W. (1995)

Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies  
Pure and Applied Chemistry 67, 331-343