

RÉSOLUTION OIV-OENO 262-2014

COPOLYMERES ADSORBANTS PVI/PVP - CODEX

L'ASSEMBLEE GENERALE,

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

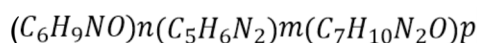
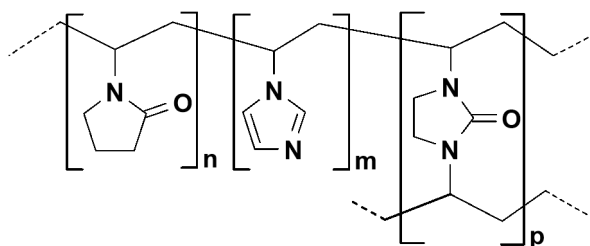
SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins, et du groupe d'experts « Spécifications des produits œnologiques » ;

CONSIDÉRANT les travaux du groupe d'experts « Sécurité alimentaire » et l'avis favorable donné par ce groupe d'experts lors de sa 21^{ème} session du 27 mars 2014,

CONSIDÉRANT les résolutions Oeno 1/2007 et Oeno 2/2007 relatives aux pratiques œnologiques,

DECIDE de compléter le *Codex oenologique international* par la monographie suivante et de modifier en conséquence les fiches correspondantes du Code international des pratiques œnologiques:

COPOLYMERES ADSORBANTS DE POLYVINYLMIDAZOLE/POLYVINYLPYRROLIDONE (PVI/PVP)



N° CAS 87865-40-5

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les copolymères adsorbants de PVI/PVP sont des poudres insolubles et légèrement hygroscopiques. Ils sont produits par polymérisation « popcorn » de N-vinylimidazole

(N° CAS 1072-63-5) et de N-vinyl-2-pyrrolidone (N° CAS 88-12-0), dans une proportion de 9 :1. Le N, N'-divinylimidazolidin-2-one (N° CAS 13811-50) est utilisé comme agent réticulant à hauteur de moins de 2 % de la masse totale des monomères.

Les copolymères adsorbants de PVI/PVP sont ajoutés au moût ou au vin conformément aux fiches décrites dans le Code des pratiques œnologiques de l'OIV à des doses inférieures à 500 mg/l.

Les copolymères adsorbants de PVI/PVP peuvent être ajoutés au moût ou au vin afin de prévenir les défauts causés par des teneurs en métaux trop élevées ou pour réduire les concentrations indésirablement élevées en métaux.

Le moût ou le vin doivent être filtrés à travers un media filtrant dont le diamètre des pores ne dépasse pas 3 microns et avec une pression de filtration n'excédant pas 0,8 bars.

2. SYNONYMES

Terpolymère de 1-vinylimidazole, 1-vinylpyrrolidone et 1,3-divinyl imidazolidinone.

Copolymère à réticulation transversale de vinylimidazole/vinylpyrrolidone.

3. ETIQUETAGE

L'étiquetage doit mentionner que le copolymère adsorbant de PVI/PVP est à usage œnologique. Les conditions de conservation et de sécurité doivent également être indiquées.

L'étiquetage doit mentionner une date limite d'utilisation de 3 ans.

4. CARACTERES

Poudre de couleur blanche à jaunâtre.

Le copolymère adsorbant de PVI/PVP est insoluble dans pratiquement tous les solvants courants. Il est donc impossible de mesurer le poids moléculaire.

5. ESSAIS

5.1. Perte à la dessiccation

Tarer une capsule en métal de 50 mm de diamètre. Placer entre 0,8 et 1,4 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP, préalablement mélangé et pesé de manière précise dans le récipient. Peser l'ensemble dans une balance fermée. Sécher dans une

étuve à $140^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pendant 1 heure. Laisser refroidir dans un dessiccateur. Peser. La perte à la dessiccation doit être inférieure à 5%.

5.2. Cendres

Chauffer un creuset de porcelaine jusqu'au rouge sombre, laisser refroidir dans un dessiccateur et peser. Placer 1,5 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP dans le creuset et incinérer à masse constante dans un four à moufle à $800^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$, en laissant le creuset refroidir dans un dessiccateur après chaque incinération, la durée de la première incinération étant de 6 heures. Le cas échéant procéder à une pré-incinération de l'échantillon.

Le poids des cendres doit être inférieur à 0,02 %.

5.3. Préparation de la solution pour essais:

Après la pesée des cendres, les dissoudre dans 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (R) et 10 ml d'eau distillée. Chauffer pour activer la dissolution. Porter à 20 ml avec de l'eau distillée. 1 ml de cette solution contient les matières minérales de 0,075 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP.

5.4. Zinc

Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le zinc selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en zinc doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.5. Fer

Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le fer selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en fer doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.6. Cuivre

Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le cuivre selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en cuivre doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.7. Plomb

Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le plomb selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

5.8. Cadmium

Sur la solution pour essais préparée au point 5.3, doser le cadmium selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.9. Arsenic

Ne pas utiliser la solution pour essais préparée au point 5.3.

Doser l'arsenic selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en arsenic doit être inférieure à 2 mg/kg.

5.10. Mercure

Ne pas utiliser la solution pour essais préparée au point 5.3.

Doser le mercure selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

5.11. Impuretés organiques

Procéder à la détermination des impuretés organiques selon la méthode décrite à l'Annexe 1.

Les limites d'impuretés organiques doivent être les suivantes:

- La teneur en Vinylpyrrolidone doit être inférieure à 5 mg/kg
- La teneur en Vinylimidazole doit être inférieure à 10 mg/kg
- La teneur en Divinylimidazolidinone doit être inférieure à 2 mg/kg
- La teneur en Pyrrolidone doit être inférieure à 50 mg/kg
- La teneur en Imidazole doit être inférieure à 50 mg/kg

5.12. Mesure de l'azote total

Placer environ 450 mg du copolymère adsorbant PVI/PVP (prise d'essai *m* en mg) dans un matras à minéralisation, ajouter 10 g de Catalyseur Missouri^[1], et 3 perles de verre. Laver toutes les particules qui adhèrent au col du matras avec une faible quantité d'acide sulfurique (R). Ajouter en tout 20 ml d'acide sulfurique (R), en le faisant couler

le long des parois du matras et mélanger le contenu par rotation. Continuer l'opération d'analyse selon la méthode décrite au Chapitre II.

La teneur en azote total doit être comprise entre 26,0 et 29,0% par rapport au poids sec.

5.13. Solubilité en milieu aqueux

Placer 10 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP dans une fiole jaugée de 200 ml contenant 100 ml d'eau. Agiter le flacon et laisser reposer le contenu pendant 24 heures. Filtrer sur une membrane filtrante de 2,5 μm de diamètre de pores, puis sur une membrane filtrante de 0,8 μm de diamètre de pores. Le résidu sec restant après évaporation du filtrat sur un bain d'eau doit être inférieur à 0,5%.

5.14. Solubilité dans l'acide et dans l'alcool

Introduire 1 g de copolymère adsorbant de PVI/PVP dans un flacon contenant 500 ml du mélange suivant:

Acide acétique : 3 g

Ethanol : 10 ml

Eau : 100 ml

Laisser reposer 24 heures. Filtrer sur une membrane filtrante de 2,5 μm de porosité, puis sur une membrane filtrante de 0,8 μm de diamètre de pores. Concentrer le filtrat sur un bain d'eau. Finir l'évaporation sur un bain d'eau dans une capsule de silice tarée de 70mm de diamètre. Le résidu sec restant après évaporation doit être inférieur à 1%, en tenant compte de tout le résidu de l'évaporation des 500 ml du mélange acide acétique-éthanol-eau.

5.15. Détermination et limites des monomères dans les moûts et les vins

5.15.1. Méthode analytique

Procéder à la détermination selon la méthode décrite en annexe 2

5.15.2. Limites des monomères dans le vin^[2]

La teneur en Vinylpyrrolidone doit être inférieure à 10 $\mu\text{g/l}$

La teneur en Vinylimidazole doit être inférieure à 10 $\mu\text{g/l}$

La teneur en Pyrrolidone doit être inférieure à 25 $\mu\text{g/l}$

La teneur en Imidazole doit être inférieure à 150 $\mu\text{g/l}$

6. CONSERVATION

Le copolymère adsorbant de PVI/PVP doit être conservé dans un endroit frais. Les récipients doivent être secs et fermés hermétiquement.

Annexe 1

Détermination par chromatographie gazeuse des monomères constitutifs et/ou impuretés susceptibles d'être contenus dans des copolymères de vinylpyrrolidone-vinylimidazol (vinylimidazol, vinylpyrrolidone, pyrrolidone, divinyléthylène-urée et imidazol)

1. Principe

Recherche et dosage des monomères constitutifs et/ou impuretés susceptibles d'être contenus dans des copolymères de vinylpyrrolidone-vinylimidazol (vinylimidazol, vinylpyrrolidone, pyrrolidone, divinyléthylène-urée et imidazol).

L'analyse s'effectue par chromatographie en phase gazeuse capillaire en utilisant un détecteur spécifique des composés azotés (NSD). Les substances à analyser sont préalablement extraites du polymère par l'acétone.

2. Gamme des teneurs à déterminer

Vinylimidazol : 2-55 µg/g

Vinylpyrrolidone : 2-50 µg/g

Pyrrolidone : 2-70 µg/g

Divinyléthylène-urée : 2-33 µg/g

Imidazol : 2-50 µg/g

3. Réactifs, matériel de référence

3.1. Copolymères vinylpyrrolidone-vinylimidazol ;

3.2. Vinylimidazol, $M(C_5H_6N_2) = 94,12 \text{ g/mol}$

pureté > 99 % (CG), par ex. Fluka, article n° 95005
(R : 22-34, S : 26-36/37/39-45)

3.3. Vinylpyrrolidone (*1-vinyl-2-pyrrolidone*), $M(C_6H_9NO) = 111,14 \text{ g/mol}$

pureté = 99,8 % (CG), par ex. Fluka, article n° 95060

(R : 20/21/22-36/37/38-40, S : 26-36/37/39)

3.4. Pyrrolidone, (*2-pyrrolidone*), $M(C_4H_7NO) = 85,11 \text{ g/mol}$

pureté > 99 % (CG), par ex. Fluka, article n° 83300

(R : 36/37/38, S : 26-36)

3.5. Divinyléthylène-urée (*N,N-divinylimidazolidone*), $M(C_7H_{10}N_2O) = 138,17 \text{ g/mol}$

pureté ≥ 99 % (CG), matériel de référence BASF

(R : 36/38-40, S : 26-36/37)

3.6. Imidazol, $(C_3H_4N_2) = 68,08 \text{ g/mol}$

pureté > 99,5 % (CG), par ex. Fluka, article n° 56748

(R : 22-34, S : 26-36/37/39-45)

3.7. Benzonitrile,

pureté > 99 % (CG), par ex. Merck-Schuchardt, article n° 801800

(R : 10-35, S : 23-26-45)

3.8 Acétone,

pureté ≥ 99 % (CG), par ex. Fluka, article n° 00585

(R : 11, S : 9-16-23-33)

4. Appareillage

4.1. Chromatographe en phase gazeuse avec échantillonneur automatique, injecteur split, détecteur spécifique des composés azotés (NSD).

4.2. Colonne capillaire en silice fondue, avec un film de polyéthylène glycol, (par ex. DB-Wax, J&W Scientific)

Longueur : 30 m

Diamètre intérieur : 0,25 mm

Épaisseur du film : 0,5 µm

4.3. Système informatique d'acquisition des données

4.4. Balance analytique sensible à 0,1 mg

4.5. Verrerie et appareils de laboratoire courants

4.6. Agitateur rotatif pouvant recevoir des flacons de petite capacité par ex. 50 ml.

5. Solutions

5.1. Solution de l'étalon interne

Benzonitrile, à 250 µg/ml dans l'acétone (3.8)

5.2. Solution mère de calibrage

Préparer une solution mère de calibrage de concentrations différentes dans l'acétone (3.8) contenant du vinylimidazol, de la vinylpyrrolidone, de la pyrrolidone, de la divinyléthylène-urée et de l'imidazol à la dose de 250 mg/l à 1000 mg/l.

5.3. Solutions de calibrage

Préparer au moins deux solutions de calibrage de concentrations différentes dans l'acétone (3.8). Chaque solution doit contenir une quantité appropriée d'étalon interne ainsi que du vinylimidazol, de la vinylpyrrolidone, de la pyrrolidone, de la divinyléthylène-urée et de l'imidazol de telle sorte que les points de calibrage englobent la valeur en cours de mesure.

A titre d'exemple

4 µl-200 µl de solution mère (5.2) + 24 ml d'acétone (3.8)+ 1 ml de solution d'étalon interne (5.1)

6. Conditions chromatographiques à titre d'exemple

Températures :

Injecteur : 220 °C

Four : 160 °C

Puis programmation à raison de 5 °C/min jusqu'à 210 °C

Isotherme final : 210 °C, 7 min

Détecteur (NSD) : 250 °C

Gaz vecteur : hélium

Pression tête de colonne : 140 kPa (1,4 bar)

Split : 10 ml/min

Balayage du septum : 5 ml/min

Volume injecté : 1,0 µl

7. Vérification préalable du système analytique

7.1. Résolution

Préparer une solution de benzonitrile et de vinylimidazol (10 et 2 µg/ml dans l'acétone).

Injecter cette solution dans le chromatographe dans les conditions décrites au point 6. L'analyse est jugée satisfaisante lorsque la résolution des deux pics chromatographiques est au moins de 1,5 ($R > 1,5$) : retour à la ligne de base entre les deux pics.

7.2. Sensibilité

Pour vérifier la sensibilité :

1 Effectuer une analyse préalable d'un échantillon (8.1) dans les conditions décrites au point 6

2 ajouter à l'échantillon 2 µg/g de divinyléthylène-urée puis refaire une analyse dans les conditions décrites au point 6

Si l'échantillon ne contient pas de divinyléthylène-urée Le système est adapté lorsque le pic de la divinyléthylène-urée rajoutée présente un rapport signal/bruit de 10 au minimum.

Si l'échantillon contenait de la divinyléthylène-urée on doit observer une augmentation nette du signal.

8. Mode opératoire

8.1. Préparation des échantillons

Peser env. 2 g d'échantillon avec une précision de 0,1 mg puis les mélanger à 1 ml de solution d'étalon interne (5.1) et 24 ml d'acétone (3.8). Ensuite, extraire l'échantillon pendant 4 h sur l'agitateur rotatif (4.6) puis analyser la solution surnageante dans les conditions décrites au point 6.

Pour les déterminations de routine, analyser chaque échantillon deux fois.

8.2. Chromatogrammes en phase gazeuse

Extrait par l'acétone d'un copolymère (fig. 1)

Extrait par l'acétone d'un copolymère supplémenté avec des analytes (Fig. 2)

9. Calcul

9.1. Facteur de calibrage

Facteur de calibrage de chromatographie gazeuse $f(i)$:

$$f(i) = \frac{A(i)_0 \times m(I.S)_0}{m(i)_0 \times A(I.S)_0}$$

Avec :

- $A(i)_0$ = surface du pic de l'analyte i dans le chromatogramme de la solution de calibrage (mVs)
- $m(i)_0$ = masse initiale du produit de référence i dans la solution de calibrage [mg]
- $A(I.S.)_0$ = surface du pic de l'étalon interne dans le chromatogramme de la solution de calibrage (mVs)
- $m(I.S.)_0$ = masse initiale de l'étalon interne dans la solution de calibrage [mg]

La proportion massique $w(i)$ de l'analyte i se calcule de la manière suivante :

$$w(i) = \frac{A(i) \times m(I.S)}{A(I.S) \times m(s) \times f'(i)}$$

Avec :

- $w(i)$ = proportion massique de l'analyte i [$\mu\text{g/g}$]
- $A(i)$ = surface du pic de l'analyte i dans le chromatogramme de la solution d'échantillon (mVs)
- $A(I.S.)$ = surface du pic de l'étalon interne dans le chromatogramme de la solution d'échantillon (mVs)
- $m(I.S.)$ = masse initiale de l'étalon interne ajouté à l'échantillon [μg]
- $m(s)$ = masse initiale de l'échantillon [g]

- $f'(i)$ = facteur de calibrage moyen de chromatographie gazeuse

Pour les déterminations de routine, le résultat est arrondi à une valeur entière.

10. Caractéristiques de la méthode

10.1. Spécificité, sélectivité

Dans le chromatogramme, les pics sont identifiés d'après leur temps de rétention en comparaison avec le temps de rétention des solutions de substances pures (3.2 à 3.6) injectées dans les mêmes conditions.

Vérifier que les constituants de l'échantillon ont un temps de rétention différent de celui de l'étalon interne et que la résolution entre les pics est toujours supérieure à 1,5.

10.2. Linéarité

Lors du calibrage, les facteurs de calibrage ont été déterminés sur 6 niveaux de concentrations pour chaque analyte. Les courbes de calibrage sont des droites (cf. fig. 3-7) avec les coefficients de détermination suivants :

Vinylimidazol: $R^2 = 0,9987$

Vinylpyrrolidone : $R^2 = 0,9999$

Pyrrolidone : $R^2 = 0,9956$

Divinyléthylène-urée: $R^2 = 0,9937$

Imidazol: $R^2 = 0,9982$

10.3. Limite de détermination

Les mesures de calibrage permettent d'évaluer les limites de détermination suivantes :

Vinylimidazol : 2 $\mu\text{g/g}$

Vinylpyrrolidone : 2 $\mu\text{g/g}$

Pyrrolidone : 2 $\mu\text{g/g}$

Divinyléthylène-urée : 2 $\mu\text{g/g}$

Imidazol : 2 $\mu\text{g/g}$

10.4. Précision

Pour déterminer la précision dans des conditions répétitives, un échantillon de copolymère a été analysé 6 fois : (Tableau 1)

Tableau 1

		Vinylimidazol	Vinylpyrrolidone	Pyrrolidone	Divinyléthylène-urée	Imidazol
1. Détermination	[µg/g]	ndt*	ndtt**	4,1	ndtt	10,7
2. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	4,3	ndtt	10,8
3. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	4,2	ndtt	11,5
4. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	4,3	ndtt	11,8
5. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	3,9	ndtt	10,2
6. Détermination	[µg/g]	ndt	ndtt	3,9	ndtt	10,8
Moyenne	[µg/g]	ndt	ndtt	4,1	ndtt	11,0
Ecart type	[µg/g]			0,2		0,6
Coef. de variation	%			4,8		5,1
imprécision mesure	[µg/g]			0,6		1,7
impréc. mesure rel.	%			14		15

*ndt = non déterminable

**ndtt= non détectable

Dans l'échantillon, la vinylpyrrolidone et la divinyléthylène-urée n'ont pas pu être détectées et le vinylimidazol n'a pas pu être quantifié.

10.4.1. Répétabilité

L'échantillon copolymère a été supplémenté avec tous les analytes puis analysé à 6 reprises. La précision dans des conditions de répétition peut être déduite des taux de répétition pour la vinylpyrrolidone, la divinyléthylène-urée et le vinylimidazol. (Tableau 2)

Tableau 2

		Vinylimidazol	Vinylpyrrolidone	Pyrrolidone	Divinyléthylène-urée	Imidazol
1. Détermination	[%]	102,3	112,4	97,0	103,3	90,7
2. Détermination	[%]	98,5	101,9	89,6	102,1	91,7
3. Détermination	[%]	111,8*	111,5	105,7	111,1	112,6*
4. Détermination	[%]	102,7	103,3	91,9	104,8	94,5
5. Détermination	[%]	104,2	101,0	89,3	102,7	97,0
6. Détermination	[%]	100,4	104,9	90,4	110,3	95,4
Moyenne	[%]	101,6	105,8	94,0	105,7	93,9
Ecart type	[%]	2,2	4,9	6,4	3,9	2,6
Coef. de variation	[%]	2,2	4,7	6,8	3,7	2,8
imprécision mesure	[%]	6,6	14,8	19,2	11,8	7,8
impréc. mesure rel.	[%]	7	14	20	11	8

* = valeur aberrante selon Dixon

10.5. Taux de récupération d'ajouts

Le taux de récupération peut être calculé à partir du tableau 2,

Vinylimidazol : 101,6 %

Vinylpyrrolidone : 105,8 %

Pyrrolidone : 94,0 %

Divinyléthylène-urée : 105,7 %

Imidazol : 93,9 %

Remarque

Applicabilité à d'autres copolymères de vinylpyrrolidone-vinylimidazol

La méthode a été validée pour le Divergan HM. On peut partir du principe que la détermination est également valable pour d'autres copolymères de vinylpyrrolidone-vinylimidazol.

Annexes

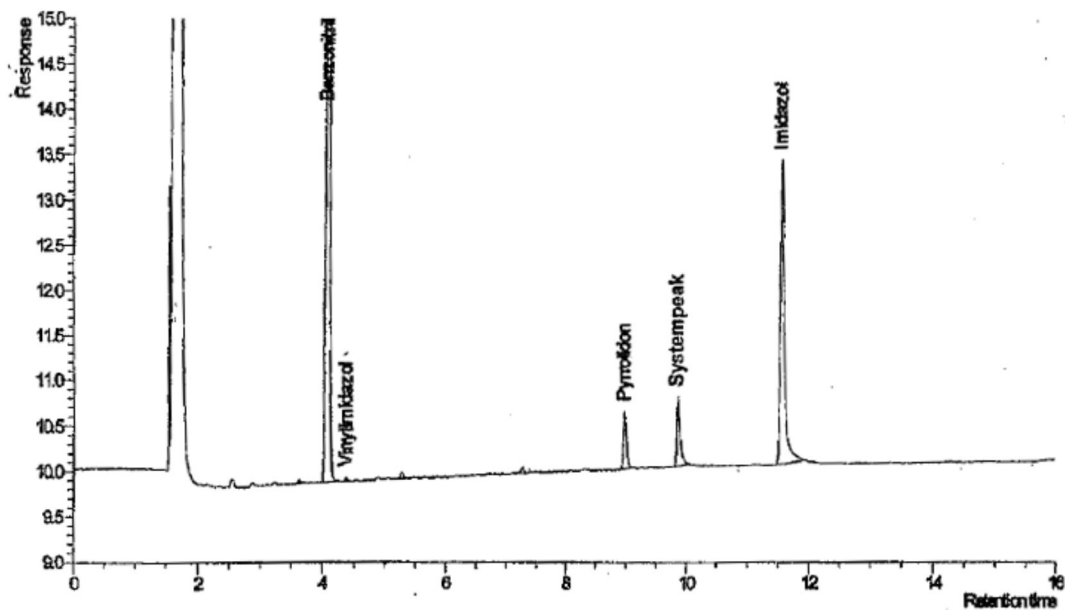


Fig. 1 : Chromatogramme de l'extrait du copolymère (avec étalon interne.)

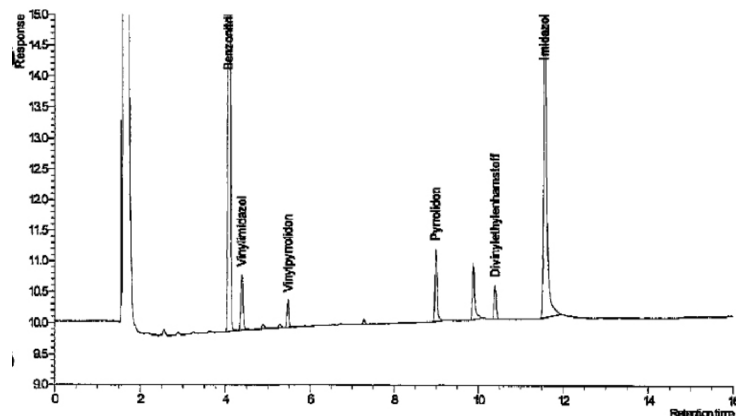


Fig. 2 Chromatogramme de l'extrait du copolymère (avec étalon interne), supplémenté par 2,1 µg/g de vinylimidazol, 2,1 µg/g de vinylpyrrolidone, 3,9 µg/g de pyrrolidone, 2,1 µg/g de divinyléthylène-urée, 12,7 µg/g d'imidazol.

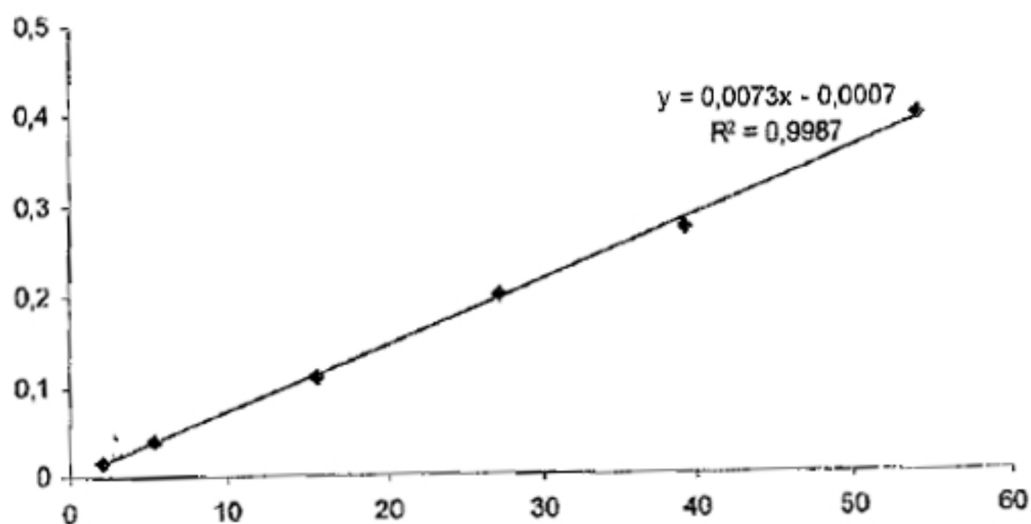


Fig. 3 : droite de calibration du vinylimidazol

Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)

Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [µg/g]

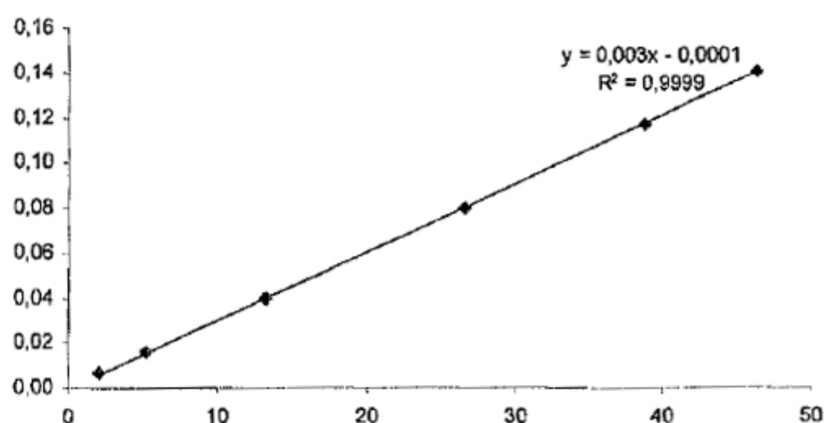


Fig. 4 : droite de calibrage de la vinylpyrrolidone

Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)

Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [$\mu\text{g/g}$]

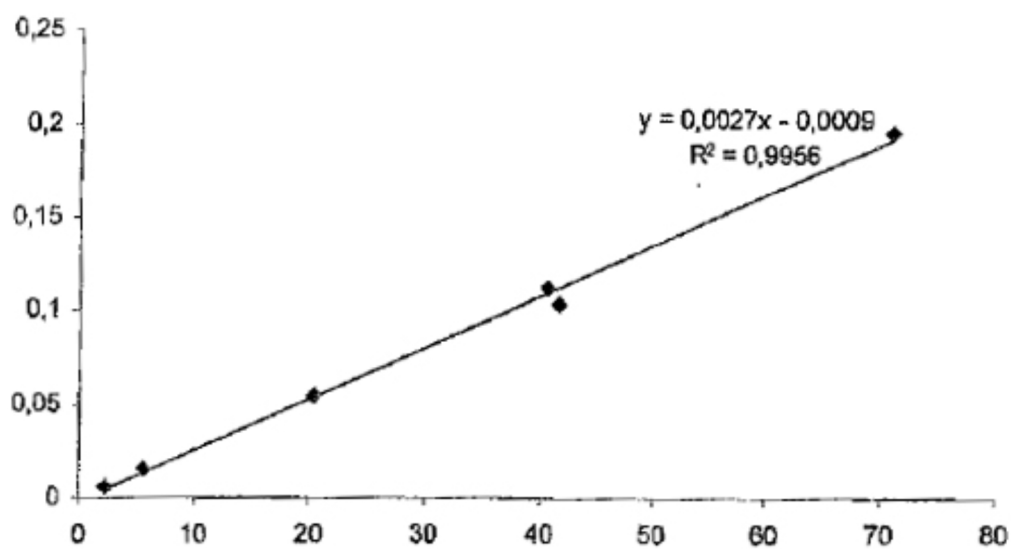


Fig. 5 : droite de calibrage de la pyrrolidone

Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)

Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [$\mu\text{g/g}$]

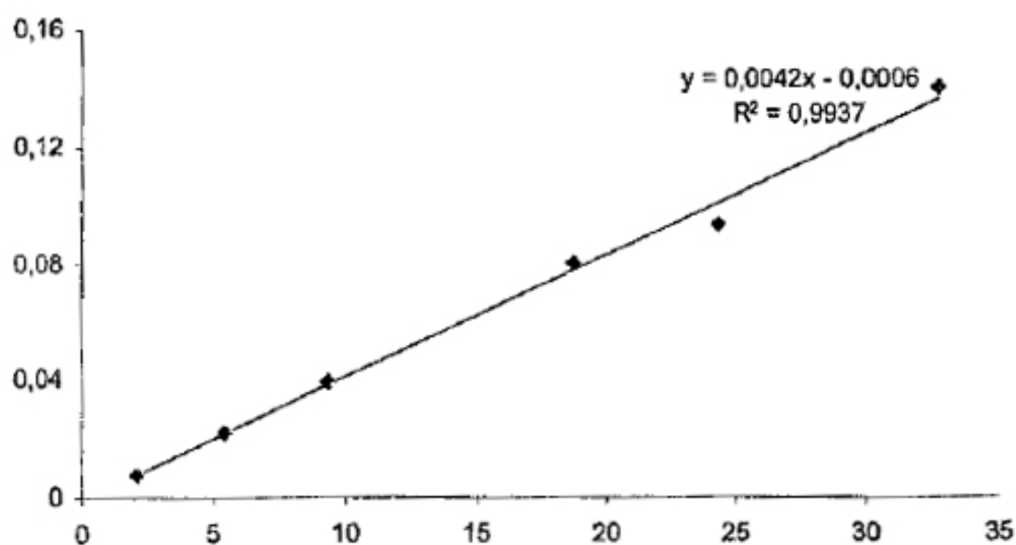


Fig. 6 : droite de calibrage de la divinyléthylène-urée

Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)

Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [µg/g]

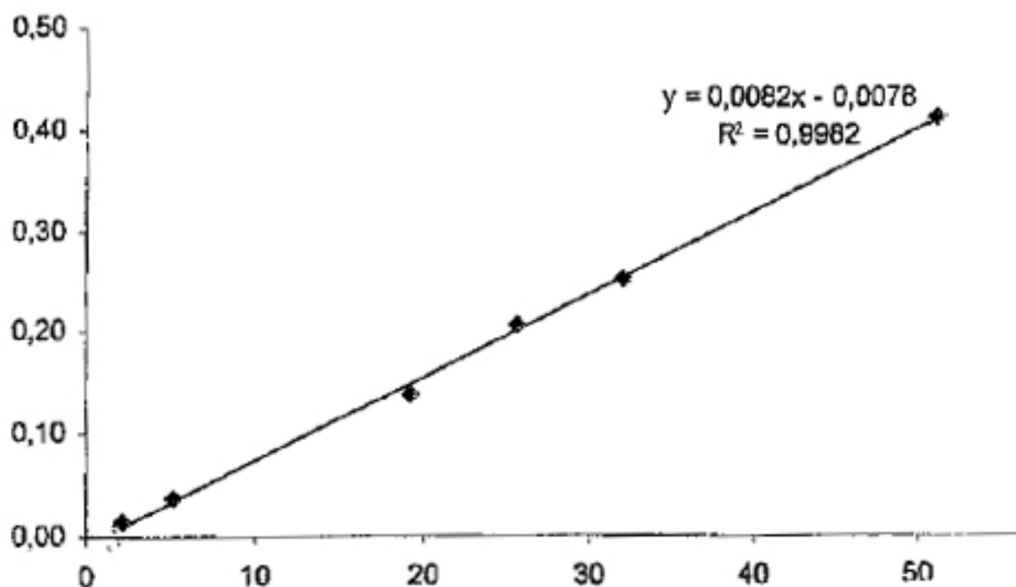


Fig. 7 : droite de calibrage de l'imidazol

Surface du pic analyte*prise d'essai (std. int.)

Surface du pic (std. int.) [mg]

Prise d'essai d'analyte par rapport prise d'essai échantillon type [$\mu\text{g/g}$]

Annexe 2

Procédé analytique pour la détection d'imidazole, de pyrrolidone et de monomères résiduels (vinylpyrrolidone, vinylimidazole, divinylimidazolidinone) dans les vins et les moûts

1. Champ d'application

Le procédé décrit convient à la détermination d'imidazole, de pyrrolidone, de vinylimidazole et de vinylpyrrolidone dans les moûts et vins blancs, rouges, doux et secs.

La divinylimidazolidinone a une demi-vie de 3,75 minutes à un pH de 3,7. Une détermination n'est donc pas possible dans le vin et le moût.

L'étude porte sur une gamme de concentration de 5 à 125 $\mu\text{g/l}$ pour l'imidazole, de 25 à 250 $\mu\text{g/l}$ pour le pyrrolidone, de 2 à 25 $\mu\text{g/l}$ pour le vinylimidazole et de 2 à 12,5 $\mu\text{g/l}$ pour le vinylpyrrolidone.

2. Définitions

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

CL-SM : Chromatographie liquide – Spectrométrie de masse

MRM : *Multiple Reaction Monitoring*

3. Principe

Des échantillons sont analysés directement par CL-SM dans une colonne de phase inversée (C18). La détection est ensuite pratiquée en mode MRM.

4. Réactifs et matières

4.1. Substances chimiques

4.1.1. Méthanol (LiChrosolv) (CAS : 67-56-1) qualité pour CL-SM

4.1.2. Eau bidistillée

4.1.3. Acide heptafluorobutyrique, puriss., $\geq 99,5$ % (CAS : 375-22-4)

4.2. Préparation des éluants

4.2.1. Solvant A :

Verser une pipette 0,6 ml d'acide heptafluorobutyrique (4.1.3) dans 1 000 ml d'eau bidistillée (4.1.2), agiter et dégazer.

4.2.2. Solvant B :

Ajouter 300 ml d'eau bidistillée (4.1.2) dans 700 ml de méthanol (4.1.1) et agiter. Verser la pipette 0,6 ml d'acide heptafluorobutyrique (4.1.3) dans cette solution, agiter et dégazer.

4.3. Étalons

4.3.1. Imidazole, $\geq 99,5$ % (CAS : 288-32-4)

4.3.2. Pyrrolidone, ≥ 99 % (CAS : 616-45-5)

4.3.3. Vinylimidazole, ≥ 99 % (CAS : 1072-63-5)

4.3.4. Vinylpyrrolidone, $\geq 99,8$ % (CAS : 88-12-0)

4.4. Préparation de solutions standard

4.4.1. Préparation des solutions mères standard (1,00 g/l) :

Doser exactement 100 mg d'étalon (4.3.1-4.3.4), le verser intégralement dans une fiole jaugée à 100 ml, ajouter de l'eau bidistillée (4.1.2) jusqu'à environ 90 ml, agiter et ajuster à 100 ml.

4.4.2. Préparation de la solution standard mixte (imidazole : 62,5 mg/l ; pyrrolidone : 62,5 mg/l ; vinylimidazole : 12,5 mg/l ; vinylpyrrolidone : 6,25 mg/l) :

Verser une pipette 6,25 ml de la solution mère d'imidazole (4.4.1), une pipette 6,25 ml de la solution mère de pyrrolidone (4.4.1), une pipette 1,25 ml de la solution mère de vinylimidazole (4.4.1) et une pipette 0,625 ml de la solution mère de vinylpyrrolidone (4.4.1) dans une fiole jaugée à 100 ml, ajouter de l'eau bidistillée (4.1.2) jusqu'à environ 90 ml, agiter et ajuster à 100 ml.

4.4.3. Préparation de la solution standard préparée :

Verser une pipette 40 µl de solution standard mixte (4.4.2) dans une fiole jaugée à 25 ml, ajouter de l'eau bidistillée jusqu'à 25 ml et agiter.

4.5. Préparation de la courbe d'étalonnage matriciel

Des solutions d'étalonnage matriciel sont préparées dans un vin ou un moût non contaminé. Diluer la solution standard mixte (4.4.2) avec l'échantillon de manière à obtenir cinq étalons de travail.

Les solutions-étalons doivent être préparées juste avant la mesure !

Volume final	Étalon mixte	Imidazole	Pyrrolidone	Vinylimidazole	Vinylpyrrolidone
25 ml	0 µl	0 µg/l	0 µg/l	0 µg/l	0 µg/l
25 ml	10 µl	25 µg/l	25 µg/l	5 µg/l	2,5 µg/l
25 ml	20 µl	50 µg/l	50 µg/l	10 µg/l	5 µg/l
25 ml	30 µl	75 µg/l	75 µg/l	15 µg/l	7,5 µg/l
25 ml	40 µl	100 µg/l	100 µg/l	20 µg/l	10 µg/l
25 ml	50 µl	125 µg/l	125 µg/l	25 µg/l	12,5 µg/l

5. Appareillage

5.1. Balance d'analyse, précision de 0,1 mg

5.2. Diverses pipettes de précision et fioles jaugées

5.3. Fioles CLHP (4 ml)

5.4. Chromatographe liquide à haute performance avec détecteur spectrométrique de masse (Applied Biosystems API 4000 ou équivalent)

5.5. Knauer Eurospher 100-5 C18 avec précolonne intégrée ou équivalent

Diamètre intérieur : 4,6 mm

Longueur : 250 mm

Phase stationnaire : C18, dimension des pores : 100 Å, dimension des particules : 5 µm, avec embout

6. Préparation des échantillons

6.1. Solution de vin modèle

La solution de vin modèle est préparée selon Martínez Rodríguez et Polo, 2000 (Characterization of the Nitrogen Compounds Released during Yeast Autolysis in a Model Wine System).

Quatre grammes d'acide tartrique, 0,1 g d'acide acétique et 120 ml d'éthanol sont dissous dans 800 ml d'eau (bidist.). Après ajustement de la valeur pH à 3,2 avec une solution d'hydroxyde de sodium 2N, la solution est complétée à 1000 ml. La solution de vin modèle est tempérée à 20 ° C.

6.2. Préparation des échantillons pour l'analyse des migrations

Une quantité de 0,5 grammes de Divergan HM est ajoutée à 1 litre de solution de vin modèle puis agitée à 20 ° C pendant 48 heures (environ 150 rpm).

Préalablement à l'analyse, l'échantillon est centrifugé (env. 3 min, 4500 rpm) et filtré à travers un filtre à membrane de 0,45 micromètre.

6.3. Autres échantillons (par exemple moûts et vins)

Les échantillons de matière claire sont directement versés dans les fioles à échantillon et passés en chromatographie sans aucune préparation. Les échantillons de vin trouble sont filtrés par un filtre à membrane de 0,45 µm avant l'injection et les premières fractions de filtrat sont éliminées.

7. Analyse CL-SM

7.1. Conditions de fonctionnement de CLHP :

Volume d'injection : 10 µl

Débit : 1 ml/min

Gradient :

$$85:15(A:B) \xrightarrow{10mn} 85:15 \xrightarrow{5mn} 0:100 \xrightarrow{10mn} 0:100$$

$$\xrightarrow{5mn} 85:15 \xrightarrow{15mn} 85:15$$

Chauffage de colonne : 25 °C

Temps d'exécution : 45 mn

7.2. Conditions de SM :

Spectromètre de masse : Applied Biosystems API 4000 ou équivalent

Type de balayage : MRM

Polarité : Positive

Source d'ions : Turbo Spray

Durée : 20 005 mn ; 1 364 cycles

Barrière de gaz : 40 psi

Tension de pulvérisation ionique : 2 500 V

Température : 550 °C

Gaz source d'ions 1 : 60 psi

Gaz source d'ions 2 : 60 psi

Gaz de collision : Moyen

Potentiel d'entrée : 10 V

Collier 2 : 0

Composé	Masse Q1 (amu)	Masse Q3 (amu)	Pause (msec)	Paramètre	Démarrage	Arrêt
Imidazole	69,08	42,20	75,00	PD	81,00	81,00
				EC	31,00	31,00
				PSCC	2,00	2,00

Pyrrolidone				PD	66,00	66,00
	86,10	44,10	75,00	EC	31,00	31,00
				PSCC	6,00	6,00
				PD	66,00	66,00
	86,10	69,00	75,00	EC	23,00	23,00
				PSCC	4,00	4,00
Vinylimidazole				PD	71,00	71,00
	95,09	41,10	75,00	EC	33,00	33,00
				PSCC	0,00	0,00
				PD	71,00	71,00
	95,09	69,20	75,00	EC	29,00	29,00
				PSCC	12,00	12,00
Vinylpyrrolidone				PD	51,00	51,00
	112,08	69,20	75,00	EC	21,00	21,00
				PSCC	4,00	4,00
				PD	51,00	51,00
	112,08	84,00	75,00	EC	17,00	17,00
				PSCC	14,00	14,00
				PD	51,00	51,00

- PD : Potentiel de dissociation (en volts)
- EC : Énergie de collision (en volts)

- PSCC : Potentiel de sortie des cellules de collision (en volts)

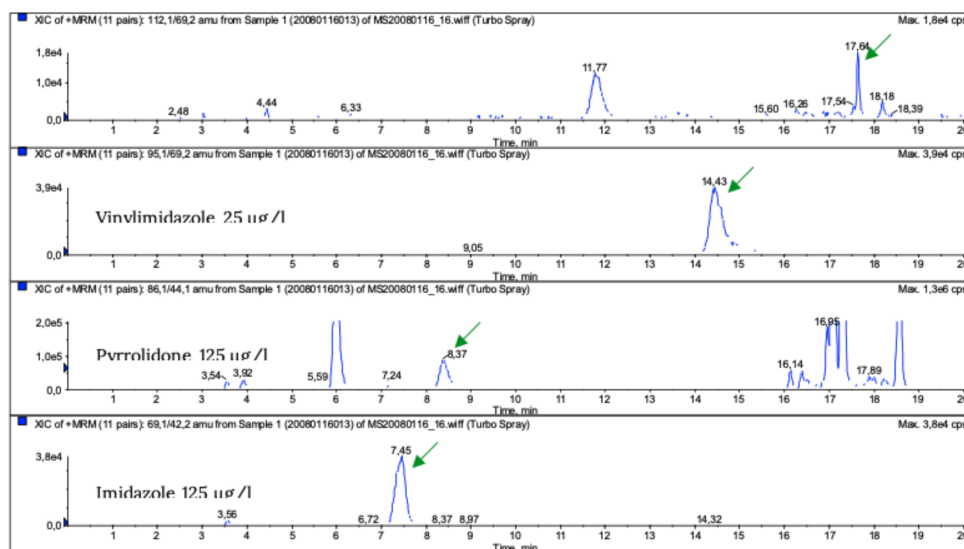
8. Évaluation

8.1. Identification :

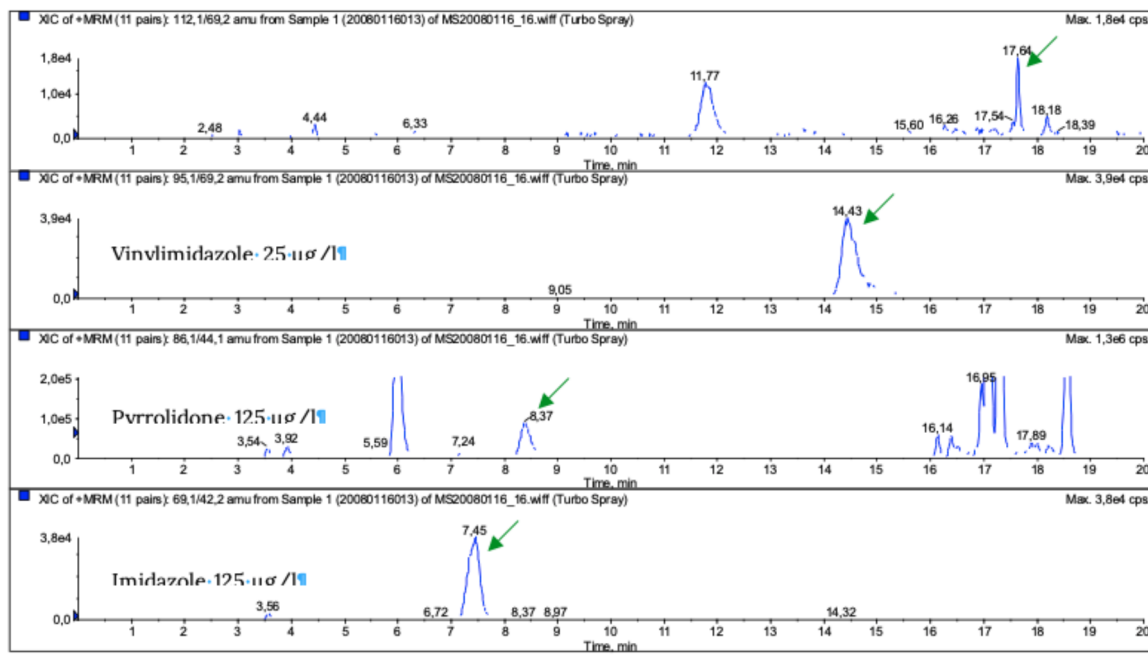
Injecter 10 µl de solution standard préparée (4.4.3) pour examiner les temps de rétention. Temps de rétention approximatifs :

Composé	Temps de rétention
Imidazole	7,45 mn
Pyrrolidone	8,37 mn
Vinylimidazole	14,43 mn
Vinylpyrrolidone	17,64 mn

Chromatogramme d'un étalon matriciel dans du vin blanc :



Chromatogramme d'un étalon matriciel dans du vin blanc :



8.2. Quantification :

Transferts de masse pour quantification :

Composé	Transfert de masse
Imidazole	69,1 $\square$ 42,2
Pyrrolidone	86,1 $\square$ 44,1
Vinylimidazole	95,1 $\square$ 69,2
Vinylpyrrolidone	112,1 $\square$ 69,2

Ajouter des doses standard pour la quantification.

8.3. Expression des résultats

Les résultats doivent être exprimés en $\mu\text{g/l}$ pour l'imidazole, le pyrrolidone, le vinylimidazole et le vinylpyrrolidone, sans décimales (ex. : 3 $\mu\text{g/l}$).

8.4. Limite de détection et limite de quantification

Le seuil de détection (LD) et le seuil de quantification (LQ) dépendent des conditions individuelles de mesure de l'analyse chimique et doivent être déterminés par la personne appliquant le procédé.

Le seuil de détection (LD) et le seuil de quantification (LQ) ont été estimés sur la base des instruments et des conditions spécifiés ci-avant (s. 7) à titre d'exemple, suivant les instructions de la résolution OENO 7-2000 (E-AS1-10-LIMDET) « Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse ». Conformément au « Diagramme logique pour la prise de décision » au n° 3, l'approche graphique doit être appliquée selon les dispositions du paragraphe 4.2.2. À cette fin, une partie du chromatogramme MRM est développée pour montrer une gamme de largeurs du pic $\times 10$ à mi-hauteur ($w_{1/2}$) d'un pic de substance à analyser dans la partie concernée du chromatogramme. En outre, deux lignes parallèles sont tracées, englobant simplement l'amplitude maximale de la fenêtre de signaux. La distance de ces deux lignes donne h_{max} , exprimée en unités d'abondance ; elle est ensuite multipliée par 3 pour LD et par 10 pour LQ, puis convertie en unités de concentration avec le facteur de réponse individuel.

Composé	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)
Imidazole	5 $\mu\text{g/l}$	12 $\mu\text{g/l}$
Pyrrolidone	25 $\mu\text{g/l}$	83 $\mu\text{g/l}$
Vinylimidazole	2 $\mu\text{g/l}$	6 $\mu\text{g/l}$
Vinylpyrrolidone	2 $\mu\text{g/l}$	6 $\mu\text{g/l}$

9. Précision et exactitude

À l'instar des matrices, trois différents vins (vin blanc sec, vin rouge sec et vin rouge doux) et du jus de raisin ont été utilisés. La reproductibilité en laboratoire, la répétabilité et la récupération ont été calculées sur la base de l'étalonnage matriciel et de trois mutages (imidazole : 40/60/80 µg/l ; 2-pyrrolidone : 40/60/80 µg/l ; vinylimidazole : 8/12/16 µg/l ; vinylpyrrolidone : 4/6/8 µg/l).

9.1. Imidazole

	Mutage	Série moyenne	Écart-type	Correspondance CV	Rel. std. Horwitz %
Reproductibilité en laboratoire (SD_{WR}) :	40 µg/l	41	2	5 %	26
	60 µg/l	61	3	5 %	24
	80 µg/l	80	5	6 %	23
Répétabilité (SD_r) :	40 µg/l	41	1	2 %	
	60 µg/l	61	2	3 %	
	80 µg/l	80	4	5 %	
Récupération (WDF) :	40 µg/l	102 %			
	60 µg/l	101 %			
	80 µg/l	101 %			
	Ø	101 %			

9.2. Pyrrolidone

	Mutage	Série moyenne	Écart-type	Correspondance CV	Rel. std. Horwitz %
Reproductibilité en laboratoire (SD_{wIR}) :	40 µg/l	42	9	22 %	26
	60 µg/l	60	9	15 %	24
	80 µg/l	81	9	11 %	23
Répétabilité (SD_r) :	40 µg/l	42	5	12 %	
	60 µg/l	60	4	7 %	
	80 µg/l	81	8	9 %	
Récupération (WDF) :	40 µg/l	105 %			
	60 µg/l	100 %			
	80 µg/l	101 %			
	Ø	102 %			

9.3. Vinylimidazole

	Mutage	Série moyenne	Écart-type	Correspondance CV	Rel. std. Horwitz %
Reproductibilité en laboratoire (SD_{wIR}) :	8 µg/l	8	0	4 %	33
	12 µg/l	12	1	5 %	31
	16 µg/l	16	1	4 %	30

Répétabilité (SD_r) :	8 µg/l	8	0	4	%
	12 µg/l	12	0	3	%
	16 µg/l	16	0	3	%
Récupération (WDF) :	8 µg/l	101	%		
	12 µg/l	102	%		
	16 µg/l	102	%		
	Ø	102	%		

9.4. Vinylpyrrolidone

	Mutage	Série moyenne	Écart-type	Correspondance CV	Rel. std. Horwitz %
Reproductibilité en laboratoire (SD_{wIR}) :	4 µg/l	3	1	31	%
	6 µg/l	4	1	26	%
	8 µg/l	5	2	29	%
Répétabilité (SD_r) :	4 µg/l	3	1	25	%
	6 µg/l	4	1	22	%
	8 µg/l	5	1	26	%
Récupération (WDF) :	4 µg/l	66	%		
	6 µg/l	63	%		
	8 µg/l	66	%		
	Ø	65	%		

^[1] Catalyseur Missouri (= 49,9 % K₂SO₄ + 49,8 % Na₂SO₄ + 0,3 % CuSO₄), Merck, Darmstadt ou équivalent

^[2] Le calcul de la limite supérieure a été basée sur les résultats obtenus sur des tests de migration = la dose recommandée de 0,5 g / l, le temps maximum d'application de 48 heures et une température de traitement de 20°C, multipliée par un facteur de 2.

Dans des conditions acides (faibles valeurs de pH) la Divinylimidazolidinone (Divinyl éthylène-urée) n'est pas stable et se dégrade donc en Imidazolidinone et vinylalcool . En outre l'imidazolidinone se dégrade en urée et en éthylène glycol. Le vinylalcool est en équilibre chimique avec l'acétaldéhyde.

L'imidazolidinone a été inclus dans l'évaluation toxicologique ainsi que l'acétaldéhyde, l'urée et l'éthylène glycol.