RESOLUTION OIV-OENO 662A-2022

BESTIMMUNG VON OCHRATOXIN A IN TRAUBENSAFT, RÜCKVERDÜNNTEM TRAUBENSAFT, KONZENTRIERTEM TRAUBENSAFT UND TRAUBENNEKTAR MITTELS IMMUNAFFINITÄTSSÄULE UND Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie MIT FLUORESZENZDETEKTION

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

GESTÜTZT auf Artikel 2 Absatz 2 iv des Übereinkommens vom 3. April 2001 zur Gründung der Internationalen Organisation für Rebe und Wein,

AUF VORSCHLAG der Unterkommission „Analysemethoden“,

BESCHLIESST, die folgende Methode einzufügen:

Bestimmung von Ochratoxin A in Traubensaft, rückverdünntem Traubensaft, konzentriertem Traubensaft und Traubennektar mittels Immunaffinitätssäule und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion

Typ IV-Methode

Für Traubensaft, rückverdünnten Traubensaft und Traubennektar: Anwendung der Methode OIV-MA-AS315-10 der *Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most*

Für konzentrierten Traubensaft: Der Saft wird im Verhältnis 1:5 (m/m) mit Wasser verdünnt, bevor wie in Ziffer 5.1 beschrieben vorgegangen wird. Diese Verdünnung wird bei der endgültigen Berechnung der OTA-Konzentration in folgender Gleichung als Verdünnungsfaktor (F) berücksichtigt:

$$C_{OTA} = MA \times F/V1 \times V3/V2$$

Methodenvorschlag:

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

Bestimmung von Ochratoxin A in Traubensaft, rückverdünntem Traubensaft, konzentriertem Traubensaft und Traubennektar mittels Immunaffinitätssäule und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion

Typ IV-Methode

1. Anwendungsgebiet

Die Methode dient der Bestimmung von Ochratoxin A (OTA) in Traubensaft, rückverdünntem Traubensaft, konzentriertem Traubensaft und Traubennektar in Konzentrationen von 0,2 µg/L bis 10 µg/L.

2. Prinzip

Die Methode nutzt eine Immunaffinitätssäule und die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). OTA wird mit Methanol eluiert und durch HPLC nach Trennung mittels Umkehrphase und Fluoreszenzdetektion quantitativ bestimmt.

3. Reagenzien und Chemikalien

3.1. Reagenzien zur Trennung von OTA an einer Immunaffinitätssäule. Die unten aufgeführten Reagenzien dienen als Anhaltspunkt. Werden von Lieferanten von Immunaffinitätssäulen Verdünnungslösungen und Eluenten angeboten, die für ihre Produkte geeignet sind, sollten diese vorzugsweise verwendet werden.

3.1.1. di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) CAS [10028-24-7]

3.1.2. Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) CAS [10049-21-5]

3.1.3. Natriumchlorid (NaCl) CAS [7647-14-5]

3.1.4. Reinstwasser für Laborzwecke, z.B. gemäß EN ISO 3696

3.1.5. Phosphatpuffer (Verdünnungslösung)

60.0 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1) und 8,8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) in 950 mL Wasser lösen (3.1.4) und mit Wasserauf 1 Liter auffüllen

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

3.1.6. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Waschlösung)

2,85 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1), 0,55 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) und 8,70 g NaCl in 950 mL Wasser lösen und mit Wasser (3.1.4) auf 1 Liter auffüllen

3.1.7. Methanol (Reinheit ≥ 99,9 %) (CH_3OH) CAS [67-56-1]

3.2. Reagenzien für die HPLC

3.2.1. Acetonitril für HPLC (CH3CN) CAS [75-05-8]

3.2.2. Essigsäure (Reinheit 100 %) (CH3COOH) CAS [64-19-7]

3.2.3. Mobile Phase: Wasser: Acetonitril: Essigsäure, 99:99:2, v/v/v (Richtwerte)

990 mL Wasser (3.1.4) mit 990 mL Acetonitril (3.2.1) und 20 mL Essigsäure (3.2.2) mischen. Ungelöste Bestandteile durch ein Filter (0,45 µm) filtrieren. Entgasen (z.B. mit Helium), sofern die verwendete HPLC-Anlage keinen Entgasungsschritt umfasst.

3.3. Reagenzien für die Herstellung der OTA-Stammlösung

3.3.1. Toluol ($C_6H_5CH_3$) CAS [108-88-3]

3.3.2. OTA (Reinheit ≥ 99,5 %) CAS [303-47-9]

3.3.3. Lösemittelgemisch (Toluol: Essigsäure, 99:1, v/v).

99 Volumenteile Toluol (3.3.1) mit einem Volumenteil Essigsäure mischen (3.2.2)

Eine handelsübliche Lösung einer Standardkonzentration (ca. 50 µg/mL) mit einem Analysezertifikat, in dem der Referenzwert und die Unsicherheit der Konzentration angegeben sind, ist der Verwendung von OTA in fester Form vorzuziehen.

3.4. OTA-Stammlösung

1 mg OTA in einem Kolben lösen oder, wenn das OTA nach dem Verdampfen in Form eines Films vorliegt, den gleichen Gehalt im Lösungsmittelgemisch (3.3.3) lösen, um eine Lösung mit einer Konzentration von etwa 20 bis 30 µg/mL OTA zu erhalten.

Zur Bestimmung der genauen Konzentration wird ggf. das Absorptionsspektrum zwischen 300 und 370 nm in einer Quarz-Küvette mit einer optischen Weglänge von 1 cm aufgenommen, wobei das Lösungsmittelgemisch (3.3.3) als Blindprobe verwendet wird. Die Bestimmung des Absorptionsmaximums und die Berechnung der OTA-

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

Konzentration (COTA) in µg/mL erfolgt nach der folgenden Gleichung:

$$C_{OTA} = A_{MAX} \times M \times 100/\square \times \square$$

Hierbei sind:

A_{MAX}= Absorption, bestimmt durch die maximale Wellenlänge (etwa 333 nm)

M = OTA Molmasse = 403,8 g/mol

□ = molarer Extinktionskoeffizient von OTA im Lösungsmittelgemisch (3.3.3) (□ = 544 m^2/mol)

□ = optische Weglänge (cm)

Die Lösung ist bei -18° C mindestens 4 Tage haltbar.

3.5. OTA-Standardlösung, 2 □g/mL (Toluol: Essigsäure, 99:1, v/v)

Die Stammlösung (3.4) mit dem Lösungsmittelgemisch (3.3.3) verdünnen, um eine OTA-Standardlösung mit einer Konzentration von 2 µg/mL zu erhalten.

Die Lösung kann bei + 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Ihre Stabilität sollte bei Gebrauch überprüft werden.

4. Geräte

Übliches Labormaterial, insbesondere:

4.1. Glasröhrchen (4 mL)

4.2. Analysenwaage

4.3. Messkolben

4.4. Vollpipetten

4.5. Mikropipetten

4.6. Festphasenextraktion (SPE-System) für Immunaffinitätssäulen

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

4.7. Reservoir und Strömungsrohr für Immunaffinitätssäulen

4.8. Mikrofaserfilter aus Glas

4.9. Immunaffinitätssäule für OTA

Die Säule sollte eine Beladungskapazität von mindestens 100 ng OTA aufweisen. Dadurch wird eine Aufreinigung von mindestens 80 % ermöglicht, wenn eine verdünnte Lösung der Probe aufgegeben wird, die 100 ng OTA enthält.

4.10. Flüssigkeitschromatograph mit Pumpe für die mobile Phase, die eine konstante Flussrate von 1 mL/mn für die isokratische erreichen kann. Das Einspritzsystem muss mit einer Schleife von 100 µL ausgestattet sein.

4.11. HPLC-Säule aus Stahl 150 × 4,6 mm (Innendurchmesser) befüllt mit stationärer Phase (C18, 5 µm). Es wird eine Vorsäule oder ein Vorfilter (0,5 µm) mit einer geeigneten Phase vorgeschaltet. Es können Säulen unterschiedlicher Größe verwendet werden, sofern sie ein gutes Basislinienrauschen und Hintergrundgeräusch gewährleisten, die unter anderem die Identifizierung von OTA-Peaks ermöglichen.

4.12. Der Fluoreszenzdetektor wird an die Säule angeschlossen, die Anregungswellenlänge auf 333 nm und die Emissionswellenlänge auf 460 nm eingestellt.

4.13. Datenverarbeitungssystem

4.14. UV-Spektrophotometer.

5. Probenvorbereitung (als Anhaltspunkt)

5.1. Für Traubensaft, rückverdünnten Traubensaft und Traubennektar

10 mL Probe in einen 100-mL-Erlenmeyerkolben geben, 10 mL Verdünnungslösung (3.1.5) zugeben und gut mischen. Durch ein Mikrofaserfilter aus Glas (4.8) filtrieren. Bei trüben Lösungen oder bei Ausfällungen nach dem Lösen ist eine Filtration erforderlich.

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

5.2. Für konzentrierten Traubensaft

Zunächst wird der Saft im Verhältnis 1:5 (m/m) mit Wasser (3.1.4) verdünnt. Diese Verdünnung wird bei der endgültigen Berechnung der OTA-Konzentration berücksichtigt (8). Dann 10 mL der verdünnten Probe in einen 100-mL-Erlenmeyerkolben geben, 10 mL Verdünnungslösung (3.1.5) zugeben und gut mischen. Durch ein Mikrofaserfilter aus Glas (4.8) filtrieren. Bei trüben Lösungen oder bei Ausfällungen nach dem Lösen ist eine Filtration erforderlich.

6. Durchführung

6.1. Aufreinigung mittels Immunaffinitätssäule (als Beispiel):

Die Proben werden gemäß den Anweisungen des Kit-Herstellers mit einem geeigneten Lösungsmittel verdünnt. Diese Lösung wird filtriert und über eine Immunaffinitätssäule gereinigt Die Immunaffinitätssäule (4.9) an das SPE-System anschließen (4.6) und das Reservoir (4.7) anbringen.

10 mL (entspricht 5 mL Probe) der verdünnten Lösung in das Reservoir geben. Die Lösung wird mit einem Durchfluss von 1 Tropfen pro Sekunde durch die Immunaffinitätssäule geleitet. Die Immunaffinitätssäule sollte nicht trocken laufen. Die Immunaffinitätssäule mit 5 mL Waschlösung (3.1.6) und dann mit 5 mL Wasser (3.1.4) mit einem Durchfluss von 1 bis 2 Tropfen pro Sekunde waschen. Luft durch die Säule blasen. OTA in einem Glasröhrchen (4.1) mit 2 mL Methanol (3.1.7) mit einem Durchfluss von 1 Tropfen pro Sekunde eluieren. Das Eluat bei 50° C mit Stickstoff zur Trockene eindampfen, sofort wieder in 250 µl mobiler Phase (3.2.3) lösen und bis zur HPLC-Analyse bei 4° C aufbewahren.

6.2. HPLC-Analyse

Über die Injektionsschleife 100 µl des wiederaufgelösten Extraktionsrückstands in das HPLC-System spritzen.

Betriebsbedingungen (als Beispiel)

Flussrate: 1 mL /min

Mobile Phase: Acetonitril: Wasser: Essigsäure (99:99:2, v/v/v) (3.2.3)

Fluoreszenzdetektor: Anregungswellenlänge = 333 nm

Emissionswellenlänge = 460 nm

Einspritzvolumen: 100 µL

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

7. Bestimmung von Ochratoxin A (OTA)

Für die quantitative Bestimmung von OTA sollte die Peakfläche oder die Peakhöhe zu der Retentionszeit von OTA gemessen und mit der Kalibrierkurve verglichen werden.

7.1. Kalibrierkurve (als Beispiel)

Die Kalibrierkurve ist täglich oder bei Veränderung der chromatographischen Bedingungen zu erstellen. 0,5 mL OTA-Standardlösung (3.5) mit einer Konzentration von 2 µg/mL in ein Glasröhrchen (4.1) einwiegen und unter Verwendung von Stickstoff abdampfen. Erneut 10 mL in der mobilen Phase (3.2.3) lösen, die zuvor durch ein Filter (0,45 µm) filtriert wurde. Man erhält so eine OTA-Lösung von 100 µg/L. Es werden mindestens 6 HPLC-Kalibrierlösungen in fünf 5 mL-Messkolben gemäß Tabelle 1 (Beispiel) hergestellt.

Die 5 mL Standardlösung jeweils mit der mobilen Phase auffüllen (3. 2.3).

100 µL jeder Lösung in das HPLC-System spritzen.

Tabelle 1: Kalibrierkurve

Kalibrierstandards	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6
µL filtrierte mobile Phase HPLC (3.2.3)	4990	4975	4950	4900	4770	4500
µL OTA-Lösung, 100 µg/L	10	25	50	100	250	500
OTA-Konzentration (µg/L)	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10
eingespritzte OTA (ng)	0,02	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00

HINWEISE:

1. Liegt die OTA-Konzentration der Proben außerhalb des Kalibrierbereichs, sollte eine entsprechende Verdünnung vorgenommen werden. Die Berechnung der Endkonzentration (8) sollte dann von Fall zu Fall überprüft werden.
2. Die kritischen Punkte der Methode zur Messung von Ochratoxin A mittels Immunaffinitätssäule sind in Anhang III der Methode OIV-MA-AS315-10 angeführt.

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

8. Berechnungen

Die OTA-Konzentration wird in einem aliquoten Teil der getesteten und in die HPLC-Säule eingespritzten Lösung berechnet.

Die Berechnung der OTA-Konzentration (COTA) in µg/L erfolgt nach der folgenden Formel:

$$C_{OTA} = MA \times F/V_1 \times V_3/V_2$$

Hierbei sind:

MA die Masse des Ochratoxin A (in ng), die in einem aliquoten Teil der Probe in die Säule eingespritzt und mit der Kalibrierkurve ausgewertet wird

F der Verdünnungsfaktor

V_1 das zu analysierende Probevolumen (0,01 L)

V_2 das Volumen der getesteten und in die Säule eingespritzten Lösung (100 µL)

V_3 das Volumen der Lösung, mit der das trockene Eluat gelöst wird (250 µL)

Die Wiederfindungsrate der Immunaffinitätssäulen muss im Falle einer direkten Kalibrierung mit synthetischen Lösungen berücksichtigt werden.

9. Angabe der Ergebnisse

Die OTA-Konzentration wird unter Berücksichtigung der Messunsicherheit in Mikrogramm pro Liter (µg/L) mit zwei Dezimalstellen angegeben.

10. Eigenschaften der Methode

Es wurde eine interne Validierungsstudie durchgeführt, um die Eignung der Methode für Traubensaft unter Berücksichtigung der Linearität, der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und der Genauigkeit der Methode zu beurteilen. Der letztgenannte Parameter wurde anhand der Präzision und der Richtigkeit der Methode ermittelt.

10.1. Linearität der Methode

Aus den Ergebnissen der linearen Regressionsanalyse geht hervor, dass die Methode in den in Abbildung 1 und Tabelle 2 aufgeführten Bereichen linear ist.

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

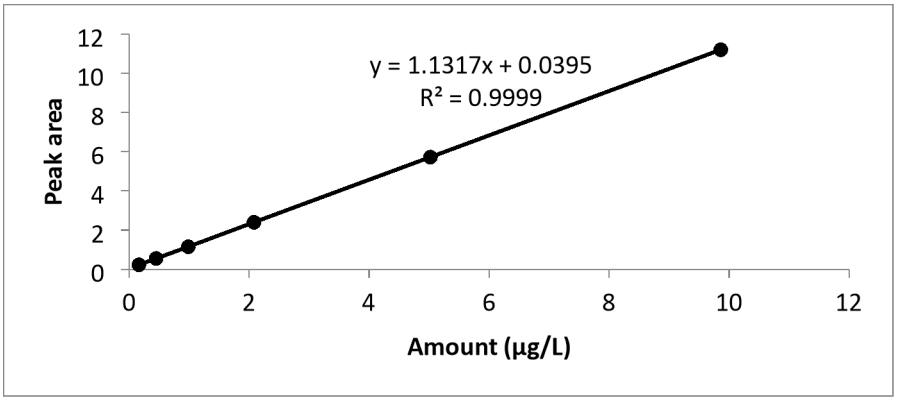

Abbildung 1: OTA Kalibrierkurve

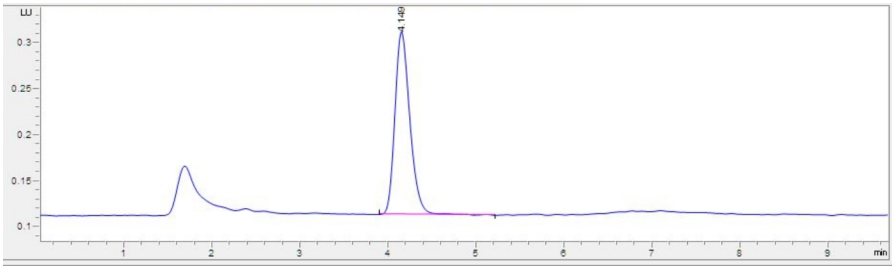

Abbildung 2: Chromatogramm eines OTA-Standards (2,0 µg/L)

10.2. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (LD) und die Bestimmungsgrenze (LQ) wurden anhand einer Serie von 8 Wiederholbestimmungen eines Traubensafts dotiert mit 0,10 µg/L OTA berechnet und entsprechen 3 Standardabweichungen für die LD und 10 Standardabweichungen für die LQ (Tabelle 2).

10.3. Genauigkeit der Methode

Berücksichtigt wurden die Wiederholbarkeit und die Reproduzierbarkeit. Die Werte dieser Parameter sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde ausgedrückt als die relative Standardabweichung bei Messungen, die für verschiedene im Traubensaft vorgefundene Konzentrationen wiederholt wurden. Die

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

Reproduzierbarkeit wurde ausgedrückt als Mittelwert der relativen Standardabweichung bei Messungen derselben Traubensaftprobe, die von verschiedenen Betreibern durchgeführt wurden.

10.4. Richtigkeit der Methode

Die Wiederfindungsrate wurde anhand einer Traubensaftprobe bestimmt, die mit OTA in 6 Konzentrationen (0,10 µg/L - 10 µg/L) dotiert wurde. Für jede Konzentration wurden 5 Bestimmungen durchgeführt. Ein Chromatogramm ist als Beispiel in Abbildung 3 aufgeführt.

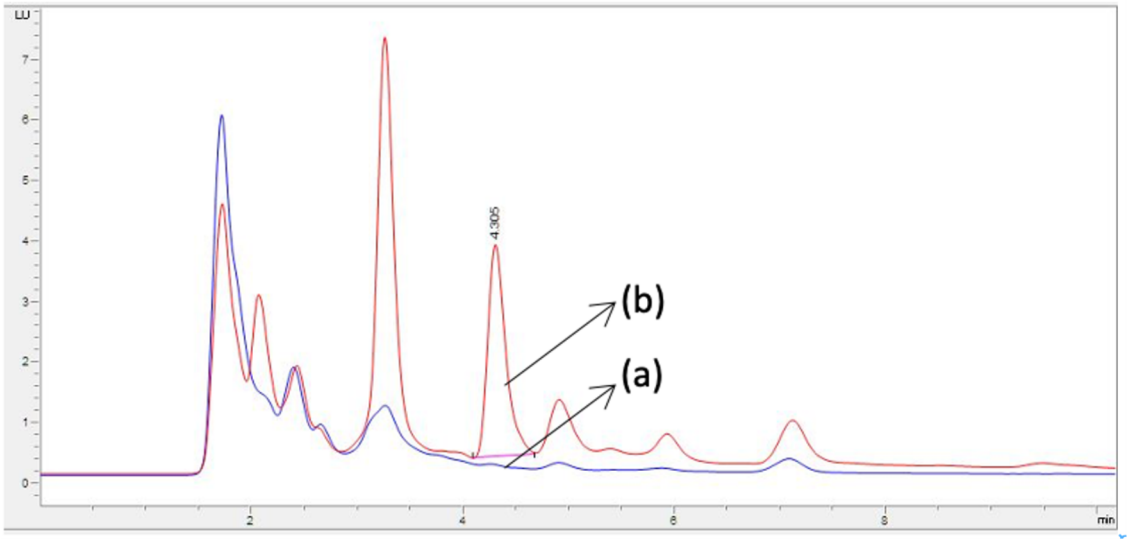

Abbildung 3: Beispiel eines Chromatogramms eines Traubensafts (a) und eines mit 2 µg/L OTA dotierten Traubensafts (b).

Tabelle 2: Eigenschaften der Methode

Linearitäts-bereich (µg/L)	Bestimmungs-koeffizient (r^2)	LD (µg/L)	LQ (µg/Ll)	Wiederholbar-keit (n=7) RSD%	Reproduzier-barkeit (n=7) RSD%	Wieder-findung (%)
0,20 - 10	0,9999	0,12	0,22	4,79	5,17	104,2 ± 2,9

11. Literatur

1. OIV-Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most, Methode OIV-

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

MA-AS315-10.

2. ISO 3696 Wasser für Analysezwecke — Spezifikationen und Testverfahren (ISO 3696:1995)

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022