RESOLUCIÓN OIV-OENO 662A-2022

DETERMINACIÓN DE LA OCRATOXINA A EN ZUMO DE UVA, ZUMO DE UVA RECONSTITUIDO, ZUMO DE UVA CONCENTRADO Y NÉCTAR DE UVA MEDIANTE COLUMNA DE INMUNOAFINIDAD Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo iv del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

A PROPUESTA de la Subcomisión “Métodos de Análisis”,

DECIDE añadir el siguiente método:

Determinación de la ocratoxina A en zumo de uva, zumo de uva reconstituido, zumo de uva concentrado y néctar de uva mediante columna de inmunoafinidad y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia

Método de tipo IV

Zumo de uva, zumo de uva reconstituido y néctar de uva: aplicar el método OIV-MA-AS315-10 del Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos.

Zumo de uva concentrado: diluir el zumo cinco veces (m/m) con agua antes de iniciar el procedimiento (apartado 5.1). Esta dilución se tiene en cuenta para calcular la concentración de OTA (apartado 7):

$C_{OTA} = MA \times F/V1 \times V3/V2$, donde F es el factor de dilución.

Propuesta de método:

Determinación de la ocratoxina A en zumo de uva, zumo de uva reconstituido, zumo de uva concentrado y néctar de uva mediante columna de inmunoafinidad y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia

Método de tipo IV

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

1. Ámbito de aplicación

En este documento se describe el método de determinación de la ocratoxina A (OTA) en zumo de uva, zumo de uva reconstituido, zumo de uva concentrado y néctar de uva, en concentraciones de entre 0,2 µg/L y 10 µg/L.

2. Fundamento

Este método emplea columna de inmunoafinidad y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La OTA se eluye con metanol y se cuantifica por HPLC de fase inversa con detector de fluorescencia.

3. Reactivos y materiales

3.1. Reactivos para separar la ocratoxina A (OTA) en columna de inmunoafinidad. Los reactivos siguientes se indican a modo de ejemplo. Algunos fabricantes de columnas de inmunoafinidad ofrecen soluciones de dilución y eluyentes específicos adaptados a sus productos, en cuyo caso se recomienda utilizarlos.

3.1.1. Hidrogenofosfato de disodio dihidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) CAS [10028-24-7]

3.1.2. Dihidrogenofosfato de sodio monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) CAS [10049-21-5]

3.1.3. Cloruro de sodio (NaCl) CAS [7647-14-5]

3.1.4. Agua purificada para laboratorio, por ejemplo de tipo EN ISO 3696

3.1.5. Tampón fosfato (solución de dilución)

Disolver 60.0 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1) y 8,8 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) en 950 mL de agua (3.1.4) y enrasar a 1 litro con agua.

3.1.6. Tampón fosfato salino (solución de lavado)

Disolver 2,85 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1), 0,55 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) y 8,70 g de NaCl (3.1.3) en 950 mL de agua (3.1.4) y enrasar a 1 litro con agua.

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

3.1.7. Metanol (pureza: ≥99,9 %) (CH_3OH) CAS [67-56-1]

3.2. Reactivos para HPLC

3.2.1. Acetonitrilo de calidad HPLC (CH_3CN) CAS [75-05-8]

3.2.2. Ácido acético (pureza: 100 %) (CH_3COOH) CAS [64-19-7]

3.2.3. Fase móvil (agua:acetonitrilo:ácido acético, 99:99:2, v/v/v) (proporciones aproximadas)

3.2.4. Mezclar 990 mL de agua (3.1.4) con 990 mL de acetonitrilo (3.2.1) y 20 mL de ácido acético (3.2.2). Si aparecen compuestos sin disolver, filtrar con un filtro de 0,45 m. Desgasificar (por ejemplo, con helio) si el equipo de HPLC utilizado no dispone de un sistema de desgasificación.

3.3. Reactivos para preparar la solución madre de OTA

3.3.1. Tolueno (C6H5CH3) CAS [108-88-3]

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

3.3.3. Mezcla de disolventes (tolueno:ácido acético, 99:1, v/v)

3.3.4. Mezclar 99 partes en volumen de tolueno (3.3.1) con una parte en volumen de ácido acético (3.2.2).

Se desaconseja el uso de OTA sólida; es preferible emplear una solución comercial de concentración conocida (aprox. 50 µg/mL) provista de un certificado de análisis donde figuren el valor de referencia y la incertidumbre de la concentración.

3.4. Solución madre de OTA

Disolver 1 mg de OTA o el contenido de una ampolla (si la OTA se ha obtenido en forma de película por evaporación) con la mezcla de disolventes (3.3.3) para obtener una solución que contenga unos 20-30 µg/mL de OTA.

Para determinar la concentración exacta (en caso necesario), medir el espectro de absorción entre 300 nm y 370 nm, en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y utilizando la mezcla de disolventes (3.3.3) como blanco. Determinar el máximo de absorción y calcular la concentración de OTA (C_{OTA}) en µg/mL con la siguiente fórmula:

© OIV 2022

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

donde:

A_{MAX} es la absorción correspondiente al máximo de absorción (alrededor de los 333 nm);

M es la masa molar de la OTA (403,8□g/mol);

□ es el coeficiente de extinción molar de la OTA en la mezcla de disolventes (3.3.3) (□□=□544□m^2/mol);

□ □es el paso óptico (cm).

Esta solución se mantiene estable a −18□°C durante al menos 4 años.

3.5. Solución patrón de OTA 2□ □g/mL (tolueno:ácido acético, 99:1, v/v)

Diluir la solución madre (3.4) con la mezcla de disolventes (3.3.3) para obtener una solución patrón de OTA con una concentración de 2□ µg/mL.

Esta solución se puede conservar refrigerada a 4□°C. Comprobar la estabilidad cuando vaya a utilizarse.

4. Equipo

Material habitual de laboratorio, en particular:

4.1. Tubos de vidrio (4□mL)

4.2. Balanza analítica

4.3. Matraces aforados

4.4. Pipetas aforadas

4.5. Micropipetas aforadas

4.6. Sistema de extracción en fase sólida (SPE) para columnas de inmunoafinidad

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

4.7. Depósito y punta de columna para columnas de inmunoafinidad

4.8. Filtros de microfibra de vidrio

4.9. Columnas de inmunoafinidad específicas para OTA

La capacidad de carga de la columna debe ser, como mínimo, de 100 ng de OTA, de modo que el rendimiento de la purificación al pasar una solución diluida de la muestra con 100 ng de OTA sea, como mínimo, del 85 %.

4.10. Cromatógrafo de líquidos con una bomba para la fase móvil que garantice un caudal constante de 1 mL/min en modo isocrático. Inyector con bucle de 100 L.

4.11. Columna de HPLC de calidad analítica de acero, 150 mm × 4,6 mm (d. i.), rellena con una fase estacionaria C18 (5 m); precolumna o prefiltro (0,5 m) con una fase adecuada. Se pueden utilizar columnas de distintos tamaños, a condición de que la línea base y el ruido de fondo permitan detectar, entre otros, los picos de OTA.

4.12. Detector de fluorescencia conectado a la columna (longitud de onda de excitación: 333 nm; longitud de onda de emisión: 460 nm)

4.13. Sistema de adquisición de datos

4.14. Espectrofotómetro UV

5. Preparación de las muestras (a modo de ejemplo)

5.1. Zumo de uva, zumo de uva reconstituido y néctar de uva

Verter 10 mL de la muestra en un matraz de Erlenmeyer de 100 mL. Añadir 10 mL de la solución de dilución (3.1.5). Mezclar bien. Filtrar con un filtro de microfibra de vidrio (4.8). Se deben filtrar las soluciones turbias o en las que aparece un precipitado tras la dilución.

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

5.2. Zumo de uva concentrado

En primer lugar, diluir el zumo 5 veces (m/m) con agua (3.1.4). Esta dilución se tiene en cuenta para calcular la concentración de OTA (apartado 8). A continuación, verter 10 mL de la muestra diluida en un matraz de Erlenmeyer de 100 mL. Añadir 10 mL de la solución de dilución (3.1.5). Mezclar bien. Filtrar con un filtro de microfibra de vidrio (4.8). Se deben filtrar las soluciones turbias o en las que aparece un precipitado tras la dilución.

6. Procedimiento

6.1. Purificación en columna de inmunoafinidad (a modo de ejemplo)

Diluir las muestras con un disolvente adecuado según las instrucciones del fabricante del kit. Filtrar y purificar esta solución en una columna de inmunoafinidad. Conectar la columna de inmunoafinidad (4.9) al sistema de extracción en fase sólida (4.6) y acoplar el depósito (4.7).

Introducir 10 mL de la solución diluida (lo que equivale a 5 mL de muestra) en el depósito. Pasar por la columna de inmunoafinidad a un ritmo de 1 gota por segundo. Evitar que la columna de inmunoafinidad se quede seca. Lavar la columna de inmunoafinidad con 5 mL de la solución de lavado (3.1.6) y, a continuación, con 5 mL de agua (3.1.4) a un ritmo de 1-2 gotas por segundo. Secar la columna con aire. Eluir OTA en un tubo de vidrio (4.1) con 2 mL de metanol (3.1.7) a un ritmo de 1 gota por segundo. Evaporar el eluido a sequedad a 50 °C con nitrógeno. Redisolver inmediatamente en 250 µL de la fase móvil de la HPLC (3.2.3) y conservar a 4 °C hasta el momento del análisis por HPLC.

6.2. Análisis por HPLC

Inyectar 100 µL de la solución reconstituida en el cromatógrafo mediante el bucle de inyección.

Condiciones cromatográficas (a modo de ejemplo)

Caudal: 1 mL/min

Fase móvil: acetonitrilo:agua:ácido acético (99:99:2, v/v/v) (3.2.3)

Detector de fluorescencia: Longitud de onda de excitación: 333 nm

Longitud de onda de emisión: 460 nm

Volumen de inyección: 100 µL

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

7. Cuantificación de la ocratoxina A (OTA)

La concentración de OTA se calcula midiendo el área o la altura del pico en el tiempo de retención de la OTA y comparando con la curva de calibración.

7.1. Curva de calibración (a modo de ejemplo)

Preparar la curva de calibración cada día de análisis o cada vez que cambien las condiciones cromatográficas. En un tubo de vidrio (4.1), introducir 0,5 mL de la solución patrón de OTA (3.5) de 2 µg/mL y evaporar el disolvente con nitrógeno. Redisolver en 10 mL de la fase móvil de la HPLC (3.2.3) previamente filtrada con un filtro de 0,45 µm. La concentración de OTA de la solución resultante es de 100 µg/L. Para calibrar el equipo de HPLC, preparar un mínimo de 6 soluciones de calibración en 5 matraces aforados de 5 mL, como en el ejemplo de la tabla 1.

Enrasar las soluciones de calibración a 5 mL con la fase móvil de la HPLC (3.2.3).

Inyectar 100 µL de cada una de ellas en el equipo de HPLC.

Tabla 1. Curva de calibración

Patrones de calibración	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 4	Sol. 5	Sol. 6
µL de fase móvil filtrada HPLC (3.2.3)	4990	4975	4950	4900	4770	4500
µL de solución de OTA con 100 µg/L	10	25	50	100	250	500
Concentración de OTA (µg/L)	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10
OTA inyectada (ng)	0,02	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00

NOTAS:

1. Si la cantidad de OTA de las muestras está fuera del intervalo de calibración, diluir en la proporción adecuada. En consecuencia, se deben ajustar los cálculos caso por caso para hallar la concentración final (8).
2. Consultar la Guía sobre los puntos críticos del método de determinación de la

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

ocratoxina A mediante columna de inmunoafinidad (anexo III del método OIV-MA-AS315-10).

8. Cálculos

Calcular la cantidad de OTA que contiene la alícuota de la solución de ensayo inyectada en la columna de HPLC.

Calcular la concentración de OTA (C_{OTA}) en µg/L con la siguiente fórmula:

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

donde:

MA es la masa de ocratoxina A (en µg) que contiene la alícuota de matriz inyectada en la columna y determinada a partir de la curva de calibración.

F es el factor de dilución

V_1 es el volumen de muestra que se quiere analizar (0,01 L)

V_2 es el volumen de solución de ensayo inyectado en la columna (100 µL)

V_3 es el volumen de solución empleado para disolver el eluido seco (250 µL)

En caso de calibración directa con soluciones sintéticas, se debe tener en cuenta la tasa de recuperación de las columnas de inmunoafinidad.

9. Expresión de los resultados

Expresar la cantidad de OTA en microgramos por litro (µg/L), con dos cifras significativas y teniendo en cuenta la incertidumbre.

10. Características del método

Se llevó a cabo un estudio de validación interna para evaluar la adecuación del método al zumo de uva. Se determinaron la linealidad, los límites de detección y cuantificación y la exactitud del método. La exactitud se determinó a partir de la precisión y la veracidad del método.

10.1. Linealidad del método

Según los resultados del análisis de regresión lineal, el método es lineal en los

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

intervalos indicados en la figura 1 y la tabla 2.

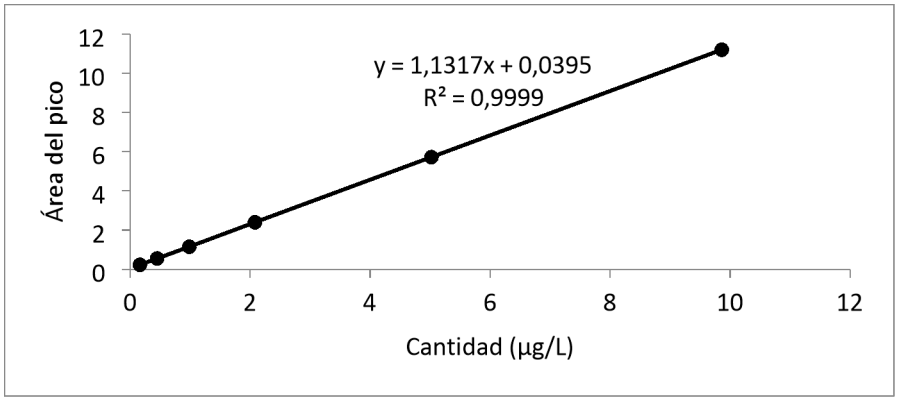

Figura 1. Curva de calibración de la OTA

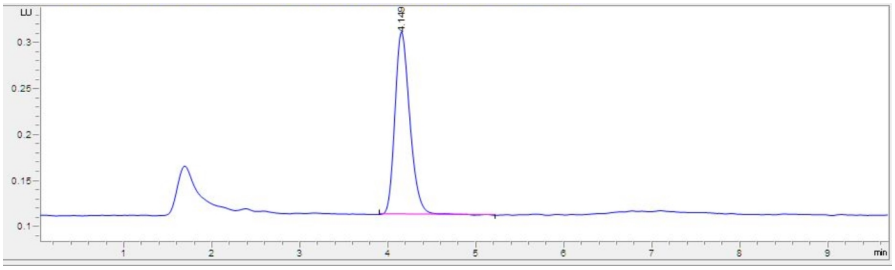

Figura 2. Cromatograma del patrón de OTA de 2,0 µg/L

10.2. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se calcularon a partir de 8 repeticiones analíticas de un zumo de uva enriquecido con 0,10 µg/L de OTA. El LD es igual a 3 veces la desviación estándar y el LC es igual a 10 veces la desviación estándar (tabla 2).

10.3. Precisión del método

Se tuvieron en cuenta la repetibilidad y la reproducibilidad, cuyos valores figuran en la tabla 2. La repetibilidad se determinó como la desviación estándar relativa de mediciones repetidas con distintas concentraciones habituales en el zumo de uva. La reproducibilidad se determinó como la media de la desviación estándar relativa de

© OIV 2022

mediciones con una misma muestra de zumo de uva realizadas por distintos operadores.

10.4. Veracidad del método

El porcentaje de recuperación se determinó a partir de una muestra de zumo de uva enriquecida con 6 concentraciones distintas de OTA (de 0,10 µg/L a 10 µg/L). Cada concentración se analizó 5 veces. En la figura 3 se muestra un ejemplo de cromatograma de recuperación.

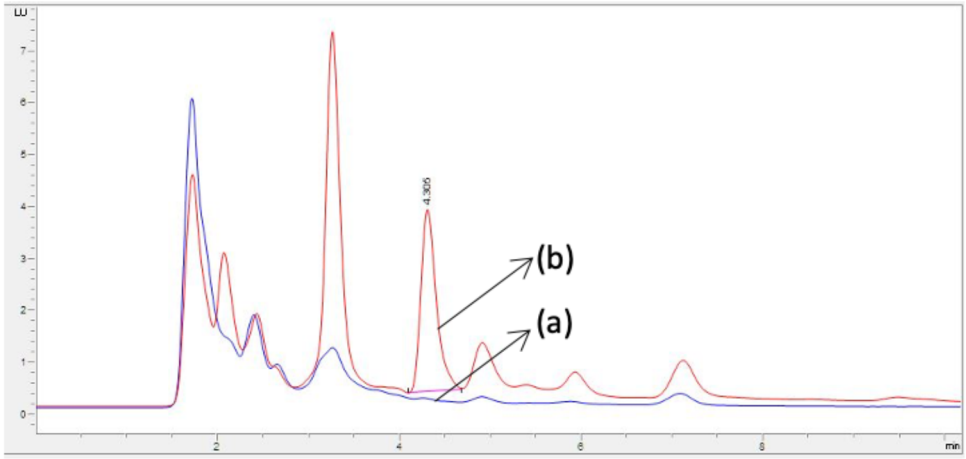

Figura 3. Ejemplo de cromatograma de recuperación de un zumo de uva (a) y un zumo de uva enriquecido con 2 µg/L de OTA (b)

Tabla 2. Características del método

Intervalo de linealidad (µg/L)	Coeficiente de determinación (r^2)	LD (µg/L)	LC (µg/L)	Repetibilidad (n=7) RSD%	Reproducibilidad (n=7) RSD%	Recuperación (%)
0,20 - 10	0,9999	0,12	0,22	4,79	5,17	104,2±2,9

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

11. Bibliografía

1. OIV. Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos. Método OIV-MA-AS315-10.

2. EN ISO 3696. Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo (ISO 3696:1995).

© OIV 2022

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA