RÉSOLUTION OIV-OENO 662A-2022

DOSAGE DE L'OCHRATOXINE A DANS LE JUS DE RAISIN, LE JUS DE RAISIN RECONSTITUÉ, LE JUS DE RAISIN CONCENTRÉ ET LE NECTAR DE RAISIN, APRÈS PASSAGE SUR COLONNE D'IMMUNOAFFINITÉ ET CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE AVEC DÉTECTION FLUORIMÉTRIQUE

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU l'article 2, paragraphe 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 « Méthodes d'analyse »,

DÉCIDE d'introduire la méthode suivante :

Dosage de l'ochratoxine A dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin après passage sur colonne d'immunoaffinité et chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique

Méthode de type IV

Pour le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué et le nectar de raisin : application de la méthode OIV-MA-AS315-10 du *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*.

Pour le jus de raisin concentré : diluer le jus cinq fois (m/m) avec de l'eau avant de procéder au point 5.1 du Mode opératoire. Prendre en compte cette dilution dans le calcul final de la concentration en OTA (point 7), suivant l'équation suivante :

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

où F est la valeur du facteur de dilution

Proposition de méthode :

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

Dosage de l'ochratoxine A dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin, après passage sur colonne d'immunoaffinité et chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique

Méthode de type IV

1. Domaine d'application

Ce document décrit la méthode utilisée pour le dosage de l'ochratoxine A (OTA) dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin à des concentrations allant de 0,2 µg/L à 10 µg/L.

2. Principe

La présente méthode utilise une colonne d'immunoaffinité et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). L'OTA est éluée avec du méthanol et quantifiée par CLHP en phase inverse avec une détection fluorimétrique.

3. Réactifs et matériels

3.1. Réactifs pour la séparation de l'OTA sur colonne d'immunoaffinité. Les réactifs indiqués ci-dessous le sont à titre d'exemple. En effet, les fournisseurs des colonnes d'immunoaffinité peuvent proposer des solutions de dilution et des éluants adaptés à leurs produits. Il est alors souhaitable d'utiliser leurs produits.

3.1.1. Hydrogénophosphate de disodium dihydraté (Na2HPO4·2H2O) (n° CAS : 10028-24-7)

3.1.2. Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté (NaH2PO4·H2O) (n° CAS : 10049-21-5)

3.1.3. Chlorure de sodium (NaCl) (n° CAS : 7647-14-5)

3.1.4. Eau purifiée pour laboratoire, par exemple de qualité EN ISO 3696

3.1.5. Tampon phosphate (solution de dilution)

Dissoudre 60,0 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1) et 8,8 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) dans 950 mL d'eau (3.1.4) et compléter à 1 L avec de l'eau

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

3.1.6. Tampon phosphate salin (solution de lavage)

Dissoudre 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) et 8,70 g de NaCl (3.1.3) dans 950 mL d'eau (3.1.4) et compléter à 1 L avec de l'eau.

3.1.7. Méthanol (pureté ≥ 99,9 %) (CH3OH) (n° CAS : 67-56-1).

3.2. Réactifs pour la CLHP

3.2.1. Acétonitrile qualité CLHP (CH_3CN) (n° CAS : 75-05-8).

3.2.2. Acide acétique (pureté = 100 %) (CH_3COOH) (n° CAS : 64-19-7).

3.2.3. Phase mobile : eau:acétonitrile:acide acétique (99:99:2, v/v/v) (proportions approximatives)

Mélanger 990 mL d'eau (3.1.4) avec 990 mL d'acétonitrile (3.2.1) et 20 mL d'acide acétique (3.2.2). En cas de présence de composés non solubilisés, filtrer sur filtre 0,45 µm. Dégazer (par exemple à l'hélium) sauf si le matériel CLHP utilisé comporte une étape de dégazage.

3.3. Réactifs pour la préparation de la solution mère d'OTA

3.3.1. Toluène ($C_6H_5CH_3$) (n° CAS : 108-88-3).

3.3.2. OTA (pureté ≥ 99,5 %) (n° CAS : 303-47-9).

3.3.3. Mélange de solvants (toluène:acide acétique, 99:1, v/v).

Mélanger 99 parties en volume de toluène (3.3.1) avec une partie en volume d'acide acétique (3.2.2).

Une solution commerciale de concentration connue (environ 50 µg/mL), avec un certificat d'analyse précisant la valeur de référence et l'incertitude de la concentration, est à préférer par rapport à l'OTA sous forme solide.

3.4. Solution mère d'OTA

Dissoudre 1 mg d'OTA ou le contenu équivalent d'une ampoule (si l'OTA a été obtenue sous forme de pellicule après évaporation) dans le mélange de solvants (3.3.3) pour obtenir une solution contenante approximativement 20 à 30 µg/mL d'OTA.

Pour déterminer la concentration exacte (le cas échéant), enregistrer le spectre d'absorption de la solution entre 300 et 370 nm dans une cuve en quartz de 1 cm de

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

chemin optique en se servant du mélange de solvants (3.3.3) comme blanc. Identifier le maximum d'absorption et calculer la concentration d'OTA (C_{OTA}) en µg/mL à l'aide de l'équation suivante :

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

où :

A_{MAX} = Absorption déterminée à la longueur d'onde maximale (à environ 333 nm),

M = masse molaire de l'OTA = 403,8 g/mol,

□ = coefficient d'extinction molaire de l'OTA dans le mélange de solvants (3.3.3) (□ = 544 m^2/mol),

□ = chemin optique (cm).

Cette solution est stable à -18 °C pour au moins 4 ans.

3.5. Solution étalon d'OTA à 2 µg/mL (toluène:acide acétique, 99:1, v/v)

Diluer la solution mère (3.4) avec le mélange de solvants (3.3.3) pour obtenir une solution étalon d'OTA à une concentration de 2 µg/mL.

Cette solution peut être conservée à +4 °C au réfrigérateur. La stabilité devrait être testée à l'usage.

4. Appareillage

Équipement usuel de laboratoire, comprenant notamment :

4.1. Tubes de verre (4 mL)

4.2. Balance analytique

4.3. Fioles jaugées

4.4. Pipettes jaugées

4.5. Micropipettes jaugées

4.6. Système d'extraction en phase solide (SPE) pour les colonnes

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

d'immunoaffinité

4.7. Réservoir et tube d'écoulement adaptés aux colonnes d'immunoaffinité

4.8. Filtres en microfibre de verre

4.9. Colonne d'immunoaffinité spécifique pour l'OTA

La colonne devrait avoir une capacité de liaison totale au moins égale à 100 ng d'OTA, permettant un rendement de purification d'au moins 85 % quand on y fait passer une solution diluée de l'échantillon contenant 100 ng d'OTA.

4.10. Chromatographe liquide, avec pour la phase mobile, une pompe capable d'atteindre un débit constant de 1 mL/min en isocratique. Système d'injection équipé d'une boucle de 100 µL.

4.11. Colonne de CLHP analytique en acier 150 × 4,6 mm (d.i.), remplie avec une phase stationnaire C_{18} (5 µm) précédée d'une pré-colonne ou d'un pré-filtre (0,5 µm) contenant une phase appropriée. Des colonnes de dimensions différentes peuvent être utilisées, pourvu qu'elles assurent une bonne ligne de base et un bruit de fond permettant de détecter le pic d'OTA parmi les autres pics

4.12. Détecteur de fluorescence relié à la colonne et dont la longueur d'onde d'excitation est fixée à 333 nm et la longueur d'onde d'émission à 460 nm

4.13. Système d'acquisition des données

4.14. Spectromètre UV

5. Préparation des échantillons (donné à titre d'exemple)

5.1. Pour le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué et le nectar de raisin

Verser 10 mL de l'échantillon dans une fiole conique (erlenmeyer) de 100 mL. Ajouter 10 mL de la solution de dilution (3.1.5). Mélanger vigoureusement. Filtrer sur filtre en microfibre de verre (4.8). La filtration est nécessaire pour les solutions troubles ou en cas de présence d'un précipité après dilution.

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

5.2. Pour le jus de raisin concentré

Diluer d'abord les jus cinq fois (m/m) avec de l'eau (3.1.4). Tenir compte de cette dilution dans le calcul final de la concentration en OTA (point 8). Puis verser 10 mL de l'échantillon dilué dans une fiole conique (erlenmeyer) de 100 mL. Ajouter 10 mL de la solution de dilution (3.1.5). Mélanger vigoureusement. Filtrer sur filtre en microfibre de verre (4.8). La filtration est nécessaire pour les solutions troubles ou en cas de présence d'un précipité après dilution.

6. Mode opératoire

6.1. Purification sur colonne d'immunoaffinité (à titre d'exemple)

Diluer les échantillons avec un solvant approprié conforme aux instructions du fabricant du kit. Filtrer cette solution et la purifier au travers d'une colonne d'immunoaffinité. Monter la colonne d'immunoaffinité (4.9) sur le système d'extraction en phase solide (4.6) et y fixer le réservoir (4.7).

Ajouter 10 mL (équivalent de 5 mL d'échantillon) de la solution diluée dans le réservoir et la faire passer dans la colonne d'immunoaffinité avec un débit d'environ 1 goutte par seconde. Il faut éviter que la colonne d'immunoaffinité soit à sec. Laver la colonne d'immunoaffinité avec 5 mL de la solution de lavage (3.1.6) puis avec 5 mL d'eau (3.1.4.) à un débit de 1 à 2 gouttes par seconde. Sécher la colonne en y faisant passer de l'air. Éluer l'OTA dans un tube de verre (4.1) avec 2 mL de méthanol (3.1.7) à un débit de 1 goutte par seconde. Évaporer l'éluat à sec à 50 °C sous azote. Redissoudre immédiatement dans 250 µL de la phase mobile de la CLHP (3.2.3) et stocker à 4 °C jusqu'à l'analyse par CLHP.

6.2. Analyse par CLHP

Injecter 100 µL de l'extrait reconstitué) dans le chromatographe à l'aide de la boucle d'injection.

Conditions opératoires (à titre d'exemple) :

Débit : 1 mL/min

Phase mobile : acétonitrile:eau:acide acétique (99:99:2, v/v/v) (3.2.3)

Détection fluorimétrique :

- longueur d'onde d'excitation = 333 nm
- longueur d'onde d'émission = 460 nm

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

Volume d'injection : 100 µL

7. Dosage de l'ochratoxine A (OTA)

Le dosage de l'OTA devrait être réalisé en mesurant les aires sous courbe (ou à défaut les hauteurs de pics) au temps de rétention de l'OTA par comparaison avec la courbe d'étalonnage.

7.1. Gamme d'étalonnage (à titre d'exemple)

Préparer une gamme d'étalonnage chaque jour d'analyse ou chaque fois que les conditions chromatographiques changent. Mesurer 0,5 mL de la solution étalon d'OTA (3.5) à 2 µg/mL dans un tube en verre (4.1) et faire évaporer le solvant sous azote. Redissoudre dans 10 mL de phase mobile de la CLHP (3.2.3) qui a été filtrée préalablement sur filtre de 0,45 µm. Ceci donne une solution d'OTA à 100 µg/L. Préparer au moins 6 solutions étalons CLHP dans 5 fiolesjaugées de 5 mL suivant le tableau 1 (à titre d'exemple).

Compléter chaque solution étalon à 5 mL avec la phase mobile de la CLHP (3.2.3).

Injecter 100 µL de chaque solution dans la CLHP.

Tableau 1. Gamme d'étalonnage

Solutions étalons	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 4	Sol. 5	Sol.6
µL de phase mobile CLHP filtrée (3.2.3)	4990	4975	4950	4900	4770	4500
µL de solution d'OTA à 100 µg/L	10	25	50	100	250	500
Concentration en OTA (µg/L)	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10
OTA injectée (ng)	0,02	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00

REMARQUES :

1. Si la quantité d'OTA dans les échantillons se situe en dehors de la gamme d'étalonnage, une dilution appropriée sera réalisée. Dans ces cas, le calcul de la concentration finale (8) devra être réexaminé au cas par cas.

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

2. Consulter le Guide concernant les points critiques de la méthode de détermination de l'ochratoxine A par colonne d'immunoaffinité (annexe III – méthode OIV-MA-AS315-10).

8. Calculs

Calculer la quantité d'OTA dans la partie aliquote de la solution test injectée dans la colonne de CLHP.

Calculer la concentration d'OTA (C_{OTA}) en µg/L à l'aide de la formule suivante :

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

où :

- MA est la masse d'ochratoxine A (en µg) dans la partie aliquote de matrice injectée sur la colonne et déterminée à partir de la courbe d'étalonnage,
- F est le facteur de dilution,
- V_1 est le volume d'échantillon à analyser (0,01 L),
- V_2 est le volume de la solution test injectée dans la colonne (100 µL),
- V_3 est le volume de solution utilisée pour redissoudre l'éluat sec (250 µL).

Le taux de recouvrement des colonnes d'immunoaffinité est à prendre en considération dans le cas d'étalonnage direct par solutions synthétiques.

9. Expression des résultats

La teneur d'OTA est exprimée en microgrammes par litre (µg/L) avec deux chiffres significatifs tenant compte de l'incertitude.

10. Caractéristiques de la méthode

La méthode a fait l'objet d'une étude de validation interne afin d'évaluer sa pertinence pour les jus de raisin, en tenant compte de la linéarité, des limites de détection et de quantification, et de l'exactitude de la méthode. Ce dernier paramètre a été déterminé

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

en définissant le niveau de fidélité et de justesse de la méthode.

10.1. Linéarité de la méthode

Sur la base des résultats obtenus grâce à l'analyse de régression linéaire, la méthode s'est révélée linéaire pour les plages indiquées sur la figure 1 et dans le tableau 2.

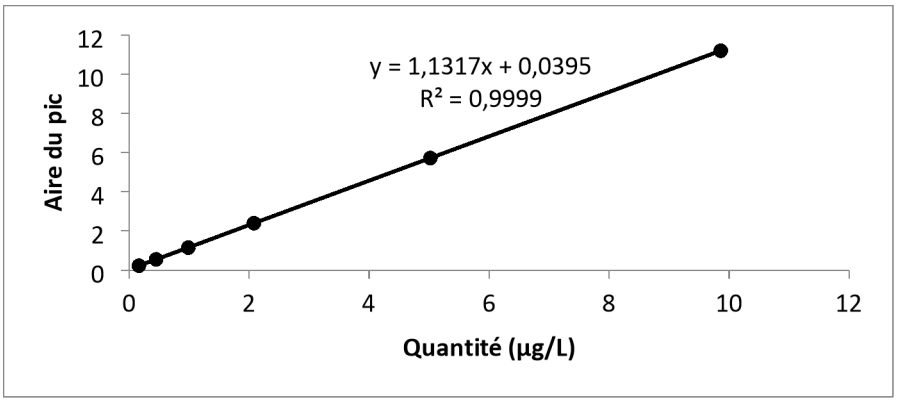

Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'OTA

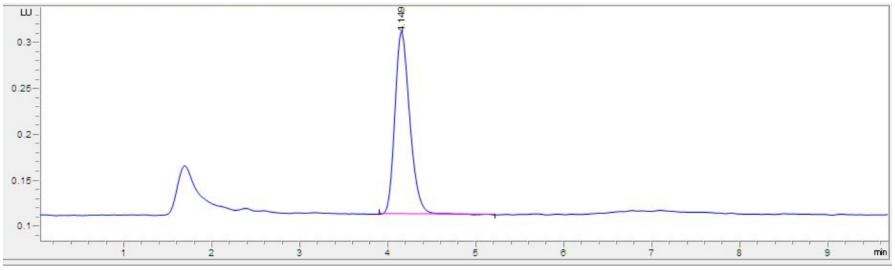

Figure 2. Chromatogramme d'une solution étalon de 2,0 Figure 2. Chromatogramme d'une solution étalon de 2,0 µg/L d'OTA

10.2. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été calculées à partir de huit répétitions analytiques d'un jus de raisin surchargé avec 0,10 µg/L d'OTA et sont égales à trois fois l'écart type pour la LD et dix fois l'écart type pour la LQ (tableau 2).

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

10.3. Fidélité de la méthode

Les paramètres pris en considération sont la répétabilité et la reproductibilité. Le tableau 2 indique les valeurs de ces paramètres. La répétabilité est exprimée par les écarts types relatifs des mesures répétées avec différentes concentrations relevées sur le jus de raisin. La reproductibilité est exprimée par la moyenne des écarts types relatifs des mesures réalisées sur le même échantillon de jus de raisin par différents opérateurs.

10.4. Justesse de la méthode

Le pourcentage de recouvrement a été déterminé en utilisant un échantillon de jus de raisin surchargé avec six concentrations différentes d'OTA, allant de 0,10 µg/L à 10 µg /L. Chaque niveau de concentration a été analysé 5 fois. Un exemple de chromatogramme de recouvrement est présenté en figure 3.

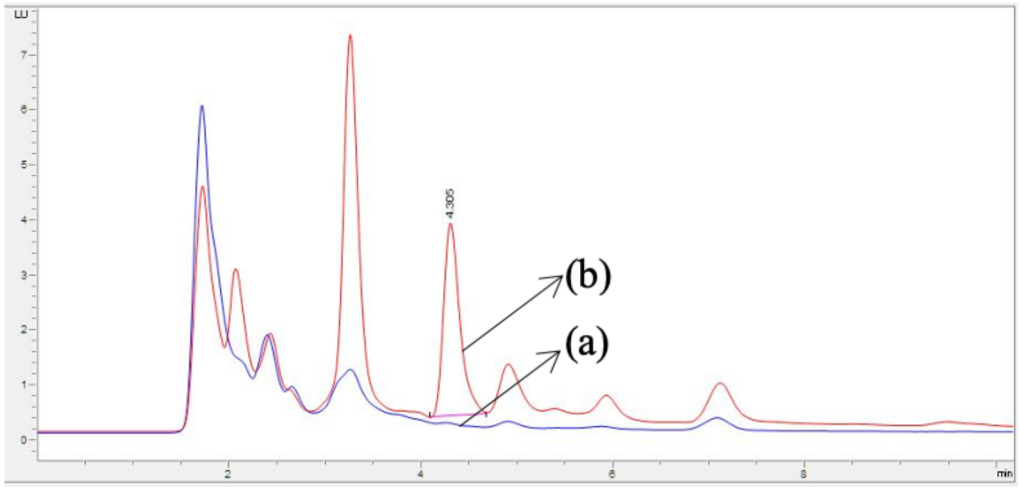

Figure 3. Exemple de chromatogramme de recouvrement d'un jus de raisin (a) et d'un jus de raisin surchargé avec 2 µg/L d'OTA (b)

Tableau 2. Caractéristiques de la méthode

Plage de linéarité (µg/L)	Coefficient de détermination (r^2)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Répétabilité (n=7) RSD%	Reproductibilité (n=7) RSD%	Recouvrement (%)

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

0,20-10	0,9999	0,12	0,22	4,79	5,17	104,2 ± 2,9

11. Bibliographie

1. OIV. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Méthode OIV-MA-AS315-10.

2. EN ISO 3696. Eau destinée à un emploi en laboratoire d'analyse — Spécifications et méthodes des tests (ISO 3696:1995).

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022