

RÉSOLUTION OIV-OENO 458-2014

DOSAGE DU LYSOZYME DANS LE VIN PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

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 « Méthodes d'analyses »,

DÉCIDE de compléter l'annexe A du *Recueil des méthodes internationales d'analyse* par la méthode de type IV suivante :

Dosage du lysozyme dans le vin par chromatographie liquide à haute performance

Type de méthode : IV

1. Introduction

Cette méthode décrit la procédure analytique pour le dosage du lysozyme dans les vins blancs et rouges. Pour les vins blancs, le dosage se réalise directement à partir de l'échantillon, tandis que pour les vins rouges, il est nécessaire de procéder à la dissociation de l'enzyme des macromolécules polyphénoliques, au moyen d'une alcalinisation brusque, en utilisant comme principe le caractère amphotère de la protéine.

2. Domaine d'application

Cette méthode permet la quantification du lysozyme (en mg de protéine·L⁻¹) présent dans les vins blancs et rouges, indépendamment de l'activité enzymatique. Il convient de préciser que cette méthode permet de détecter un ajout de lysozyme dans le vin mais que la limite de détection n'exclue aucune allergénicité associée à la présence de faibles doses de lysozyme.

3. Principe

L'analyse se réalise par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec un

détecteur spectrofluorimétrique. La teneur inconnue dans l'échantillon de vin est calculée en fonction de l'aire du pic chromatographique, en utilisant la méthodologie de l'étalon externe.

4. Matériel et réactifs

4.1. Solvants et solutions de travail

4.1.1. Acétonitrile (CH_3CN) « qualité CLHP » (CAS n° 75-05-8)

4.1.2. Acide trifluoroacétique (TFA) (CAS n° 76-05-1)

4.1.3. Eau distillée « qualité CLHP » (CAS n° 7732-18-5)

4.1.4. Étalon de lysozyme (CAS n° 9001-63-2)

4.1.5. Acide tartrique (CAS n° 87-69-4)

4.1.6. Alcool éthylique (CAS n° 64-17-5)

4.1.7. Tartrate neutre de potassium (CAS n° 921-53-9)

4.1.8. Hydroxyde d'ammonium 28 % p/p (CAS n° 1336-21-6)

4.1.9. Filtres en acétate de cellulose de 0,65 μm

4.2. Matrice : acide tartrique 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, alcool éthylique 10 % v/v ajusté à pH 3,2 avec du tartrate de potassium neutre.

4.3. Éluants

A : CH_3CN 1 %, TFA 0,2 %, H_2O 98,8 %

B : CH_3CN 70 %, TFA 0,2 %, H_2O 29,8 %

4.4. Solution de référence

Solution de 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de lysozyme étalon dissous dans la matrice par agitation continue durant une heure. Peut être conservée en conditions réfrigérées 4 semaines au maximum.

4.5. Préparation des solutions de travail

Les solutions de travail sont obtenues par dilution de la solution de référence jusqu'à obtention des concentrations souhaitées avec la matrice. Ces solutions se préparent quotidiennement.

5. Appareillage

5.1. Appareil CLHP avec système de pompage prévu pour effectuer un gradient d'élution

5.2. Logement pour colonne thermostatée (four)

5.3. Détecteur spectrofluorimétrique

5.4. Boucle d'injection, 20 µL

5.5. Colonne polymérique à phase inverse avec des groupes fonctionnels phényle (diamètre des pores = 1 000 Å, limite d'exclusion = 1 000 000 Da), Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP 7,5 cm x 4,6 mm ID, à titre d'exemple

5.6. Pré-colonne dans le même matériau que la colonne, Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel 1,5 cm x 3,2 mm ID, à titre d'exemple

6. Conditions opératoires (à titre d'exemple)

6.1. Débit d'éluant : 1 mL.min⁻¹

6.2. Température d'élution : 40 °C

6.3. Détection spectrofluorimétrique : λ_{ex} = 276 nm ; λ_{em} = 345 nm ; Gain = 4

6.4. Temps de rétention moyen du lysozyme : 7,9 minutes

Temps (min)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)
0	60	40
10,00	0	100
10,20	60	40
12,00	Controller	Arrêt

7. Préparation de l'échantillon

7.1. Vins blancs

Les échantillons de vin blanc sont filtrés avec des filtres en acétate de cellulose de 0,65 µm, et l'analyse chromatographique est effectuée a posteriori (en cas d'utilisation de filtres en nylon de 0,45 µm, le taux de récupération obtenu est moindre).

7.2. Vins rouges

Les échantillons de vin rouge (50 mL) sont portés à pH 11,5. Ils sont alcalinisés avec du NH_4OH (prendre en compte son volume pour le calcul final) et filtrés immédiatement (5 min) avec des filtres en acétate de cellulose de 0,65 μm puis injectés dans le dispositif de chromatographie liquide. En cas d'utilisation de filtres en nylon de 0,45 μm , le taux de récupération obtenu est moindre.

8. Préparation de l'échantillon de contrôle

L'échantillon subit un ajout de solution étalon de référence (4.4) et est préparé conformément au point 7. Le pourcentage de récupération est déterminé.

9. Expression des résultats

Le profil chromatographique de l'étalon de lysozyme a mis en évidence une résolution adéquate de l'analyte objet de l'étude avec les conditions chromatographiques stipulées (Fig. 1 et Fig. 4). L'analyse de l'échantillon sans lysozyme a permis d'observer le profil du vin sans présence d'interférences au niveau de la zone de détection de l'enzyme (Fig. 2 et Fig. 5).

Pour les vins blancs, la récupération de l'enzyme dépasse les 95 % (Fig. 3), tandis que la méthode suivie pour les vins rouges a mis en évidence une récupération qui varie entre 70 % et 95 % de l'enzyme, ce facteur étant fonction de la concentration en polyphénols présente dans l'échantillon de vin (Fig. 6). Le résultat est exprimé en milligrammes par litre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

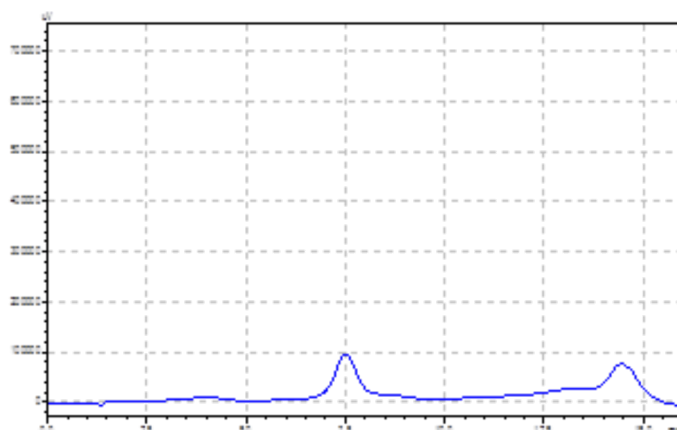
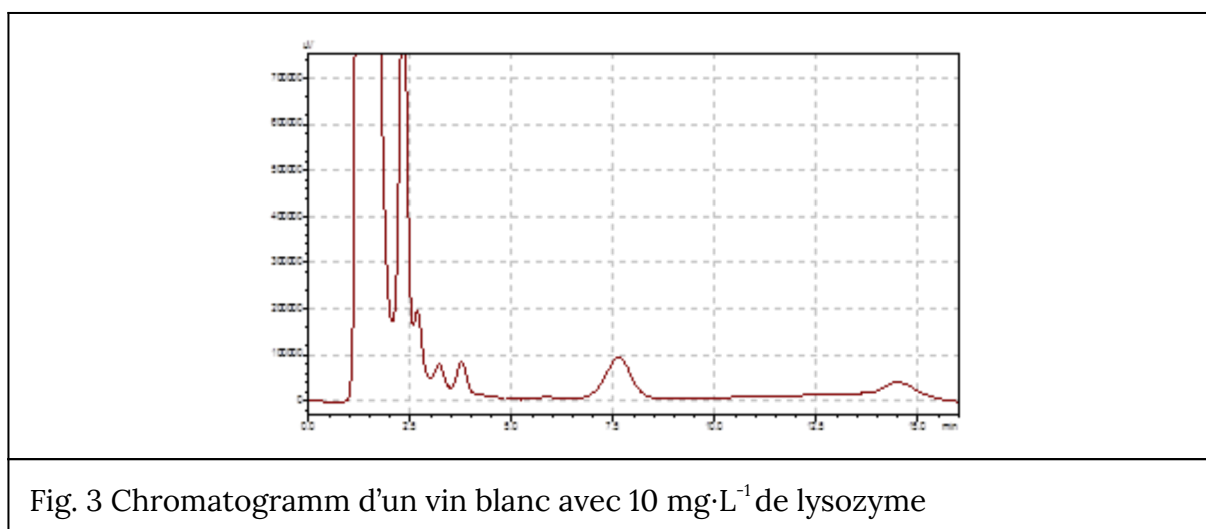
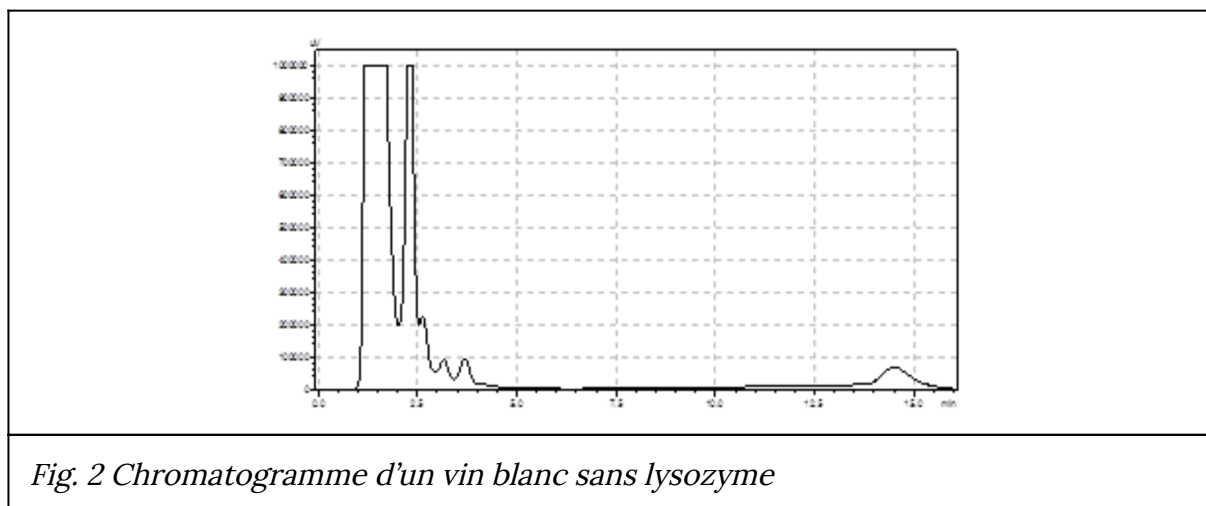


Fig. 1 Chromatogramme de l'étalon de lysozyme de 10 mg·L⁻¹.



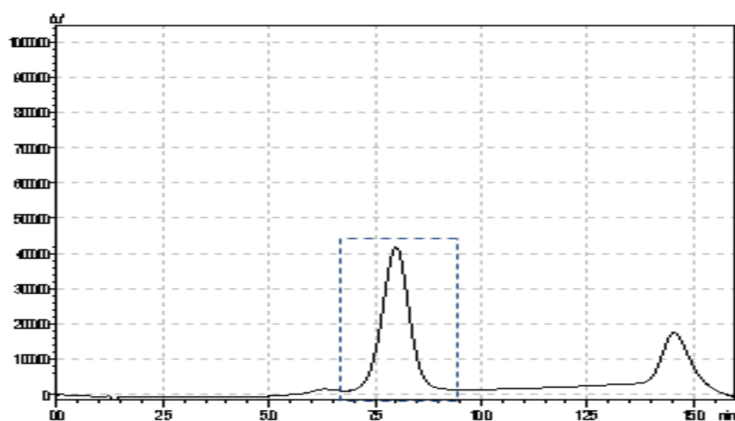


Fig. 4 Chromatogramme de l'étalon de lysozyme de 50 mg·L⁻¹.

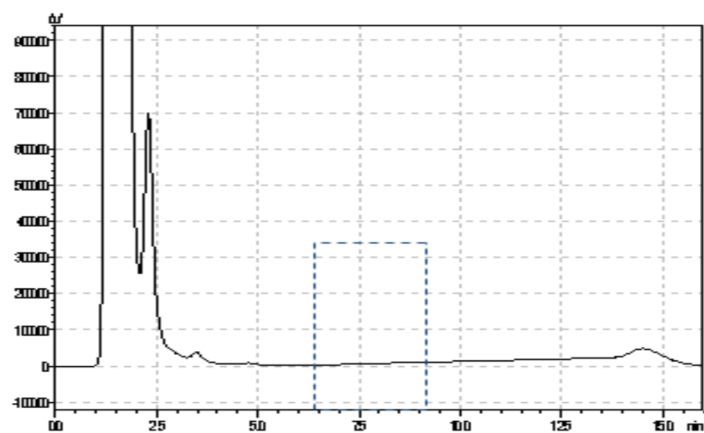


Fig. 5 Chromatogramme d'un vin rouge sans lysozyme.

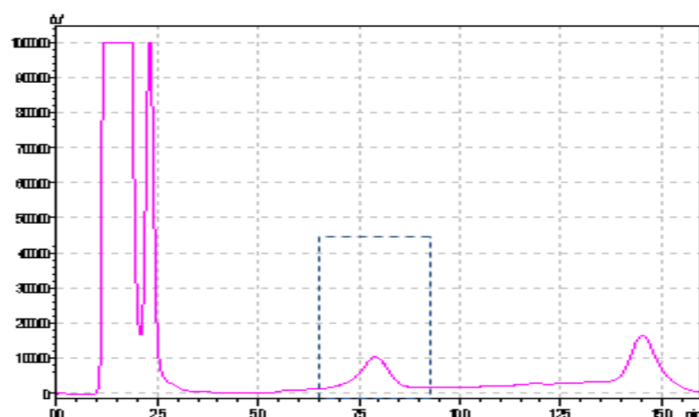


Fig. 6 Chromatogramme d'un vin rouge avec 50 mg·L⁻¹ de lysozyme.

10. Procédure analytique pour les vins blancs

10.1. Paramètres de validation en interne

10.1.1. Répétabilité

La répétabilité de la méthode a été étudiée dans l'intervalle compris 2 mg·L⁻¹ et 25 mg·L⁻¹ pour les vins blancs. 17 échantillons de vin blanc ayant été enrichis avec différentes concentrations de lysozyme ont été analysés en double.

Les résultats obtenus pour la répétabilité à un niveau de probabilité 95 % sont les suivants :

Concentration mesurée en mg·L ⁻¹	Sr mg·L ⁻¹	r (2,8xSr) mg·L ⁻¹
2	0,25	0,7
5	0,30	0,82
10	0,42	1,1
15	0,61	1,7

25	0,40	1,12
----	------	------

La limite de répétabilité (r) moyenne est de $1,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

10.1.2. Linéarité

Pour le calcul de la linéarité, 30 mesures des aires du pic de 6 concentrations différentes de lysozyme dans du vin blanc ont été réalisées, en l'occurrence blanc de vin sans lysozyme $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, avec lesquelles ont été calculés l'ordonnée à l'origine, la pente et le coefficient de corrélation.

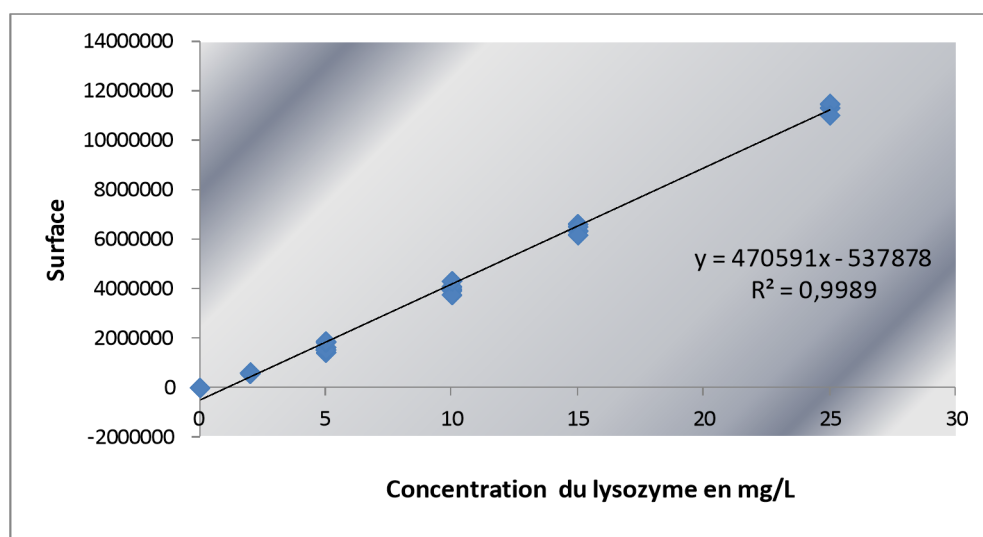


Fig. 7 Plage dynamique du lysozyme dans les vins blancs jusqu'à $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

10.1.3. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection obtenue pour cette méthode a été calculée par l'intermédiaire d'une approche graphique issue du bruit de fond de l'enregistrement.

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

LD : $0,49 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

LQ : $1,62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

10.1.4. Reproductibilité intralaboratoire

La reproductibilité intralaboratoire de la méthode a été étudiée dans un intervalle compris entre $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ à $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour un échantillon de vin blanc durant une période de 30 jours. Il convient de signaler que du fait de l'instabilité de l'analyte, l'échantillon de vin est dosé avec une solution de lysozyme de référence (4.4) le jour même de son analyse. 16 mesures ont été réalisées à intervalles réguliers.

Les résultats sont les suivants :

Concentration mesurée en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SR $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	R ($2,8\times\text{SR}$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
2	0,19	0,53
5	0,36	1,0
10	0,48	1,3
15	0,64	1,8
25	0,93	2,6

La limite de reproductibilité (R) moyenne est de $1,45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

11. Procédure analytique pour les vins rouges

11.1. Paramètres de validation en interne

11.1.1. Répétabilité

La répétabilité de la méthode a été étudiée dans l'intervalle compris entre $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour les vins rouges. 21 échantillons de vin rouge ayant été enrichis avec différentes concentrations de lysozyme ont été analysés en double.

Les résultats obtenus pour la répétabilité à un niveau de probabilité 95 % sont les suivants :

Concentration mesurée en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Sr $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	r (2,8xSr) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
5	0,38	1,06
10	0,64	1,79
15	0,59	1,65
25	0,30	0,8

La limite de répétabilité (r) moyenne est de $1,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

11.1.2. Linéarité

Pour le calcul de la linéarité, 25 mesures des aires du pic de 5 concentrations différentes de lysozyme dans du vin rouge ont été réalisées, en l'occurrence blanc de vin sans lysozyme $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, avec lesquelles ont été calculés l'ordonnée à l'origine, la pente et le coefficient de corrélation.

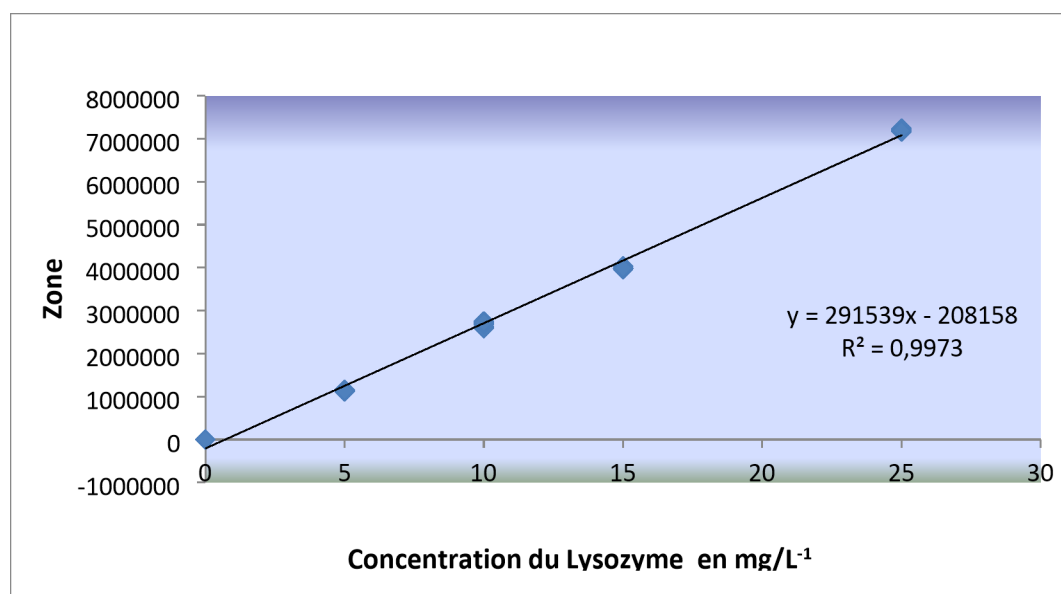


Fig. 8 Plage dynamique du lysozyme dans les vins rouges jusqu'à $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

11.1.3. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection a été calculée par l'intermédiaire d'une approche graphique issue du bruit de fond de l'enregistrement.

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

LD : 0,88 mg·L⁻¹

LQ : 2,90 mg·L⁻¹

11.1.4. Reproductibilité intralaboratoire

La reproductibilité intralaboratoire de la méthode a été étudiée dans un intervalle compris entre 5 mg·L⁻¹ à 25 mg·L⁻¹ pour un échantillon de vin rouge durant une période de 30 jours. Il convient de signaler que du fait de l'instabilité de l'analyte, l'échantillon de vin est dosé avec une solution de lysozyme de référence (4.4) le jour même de son analyse. 16 mesures ont été réalisées à intervalles réguliers.

Les résultats sont les suivants :

Concentration mesurée en mg·L ⁻¹	SR mg·L ⁻¹	R (2,8xSR) mg·L ⁻¹
5	0,4	1,12
10	0,91	2,54
15	0,54	1,5
25	0,53	1,5

La limite de reproductibilité (R) moyenne est de 1,7 mg·L⁻¹

12. Bibliographie

1. Résolution OENO 8-2007, « Dosage du lysozyme dans le vin par chromatographie liquide à haute performance » (2007).
2. Résolution OENO 10-2005, « Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative ».