RÉSOLUTION OIV-OENO 461-2012

METHODES DE DETERMINATION DE LA NATAMYCINE DANS LE VIN

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU l'article 2 paragraphe 2 iv de l'Accord portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-commission des Méthodes d'analyse des vins et des moûts,

CONSIDÉRANT que les activités de l'OIV doivent contribuer à la sécurité alimentaire ;

RECONNAIT l'absence de prescription de méthodes spécifiques officielles de détermination de la natamycine dans le vin et la possibilité d'appliquer des méthodes déjà existantes.

DÉCIDE d'adopter les deux méthodes de type IV de détermination de la natamycine dans le vin présentées ci-dessous :

1. INTRODUCTION

Différentes méthodes de détermination de la natamycine sont utilisées, reposant principalement sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la détection à réseau de diodes (DAD) ou à la spectrométrie de masse (MS). L'estimation des limites de performance - limite de détection et de quantification – est de la responsabilité des laboratoires accrédités (par exemple selon la norme ISO / EN 17025 / 2005) qui appliquent les recommandations de l'OIV (OENO 7 / 2000, E-AS1-10-LIMDET) ou d'autres directives normatives.

En l'absence d'estimation interlaboratoire fiable du niveau critique, une limite de prise de décision de 5 µg/l est provisoirement adoptée jusqu'à ce qu'une estimation fiable interlaboratoire ou d'autres indicateurs robustes soient disponibles.

2. MÉTHODES

2.1. Détermination de la natamycine (pimaricine) dans le vin par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution

2.1.1. OBJET

Cette méthode décrit une méthode d'analyse pour la détermination de la natamycine

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

(pimaricine) dans le vin. Le niveau de la natamycine est exprimé en microgrammes par litre (µg/l) de vin. Une validation interne a été effectuée avec des solutions de solvant, du vin rouge et du vin blanc sur la plage de concentration allant de 5 à 2 600 µg/l.

2.1.2. PRINCIPE

Le niveau de natamycine dans le vin est déterminé par injection directe de l'échantillon dans un système de détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HR/MS). La quantification est réalisée avec la méthode de dosage par ajouts dosés. L'échantillon est d'abord analysé une première fois afin d'obtenir une estimation de la concentration en natamycine. L'analyse est ensuite répétée avec ajouts dosés de solutions étalons mieux adaptées à la concentration en natamycine de l'échantillon.

2.1.3. RÉACTIFS

2.1.3.1. Analytes

2.1.3.1.1. Natamycine (Pimaricine) > 95 %

2.1.3.2. Produits chimiques

2.1.3.2.1. Méthanol de qualité HPLC par fluorescence (n° CAS 67-56-1).

2.1.3.2.2. Eau purifiée pour laboratoire, par exemple de qualité EN ISO 3696 (eau pour utilisation en laboratoire de chimie analytique - spécification et méthodes d'essai [ISO 3696 :1987]).

2.1.3.2.3. Acide acétique, 100 %, (n° CAS 64-19-7)

2.1.3.3. Solutions

2.1.3.3.1. Solution mère de natamycine (1 000 µg/ml)

Peser à 0,1 mg près environ 10 mg de natamycine (2.1.3.1.1) dans une fiole jaugée ambrée de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec la solution méthanol:eau:acide acétique (2.1.3.3.4). Boucher et soniquer. Calculer la concentration réelle en microgrammes de natamycine par millilitre de solution.

2.1.3.3.2. Solution de travail n°1 : natamycine (10 µg/ml)

Introduire à la pipette 100 µl de solution mère (2.1.3.3.1) dans une fiole jaugée ambrée de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec la solution méthanol:eau:acide acétique (2.1.3.3.4).

2.1.3.3.3. Solution de travail n°2 : natamycine (0,5 µg/ml)

Introduire à la pipette 500 µl de solution de travail n°1 (2.1.3.3.2) dans une fiole jaugée

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

ambrée de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec la solution méthanol:eau:acide acétique (2.1.3.3.4).

2.1.3.3.4. Solution de méthanol:eau:acide acétique (50:47:3, v/v)

Avec une éprouvette graduée, verser 500 ml de méthanol (2.1.3.2.1) dans une fiole jaugée de 1 L. Ajouter 470 ml d'eau (2.1.3.2.2) et agiter pour mélanger. Ajouter 30 ml d'acide acétique (2.1.3.2.3) et bien agiter.

2.1.3.3.5. *Méthanol, 3 % d'acide acétique*

Avec une éprouvette graduée, verser 30 ml d'acide acétique (2.1.3.2.3) dans une fiole jaugée de 1 L. Compléter jusqu'au repère avec du méthanol (2.1.3.2.1) et bien agiter.

2.1.3.3.6. Eau, 3 % d'acide acétique

Avec une éprouvette graduée, verser 30 ml d'acide acétique (2.1.3.2.3) dans une fiole jaugée de 1 L. Compléter jusqu'au repère avec de l'eau (2.1.3.2.2) et bien agiter.

2.1.4. APPAREILLAGE

REMARQUE : Un instrument ou appareil n'est répertorié que s'il est spécialisé ou conçu en fonction d'un cahier des charges particulier, la verrerie et les équipements de laboratoire habituels étant supposés disponibles.

2.1.4.1. Chromatographe en phase liquide (LC)

Équipé d'un injecteur automatique, d'une boucle d'injection de 100 µL et d'un spectromètre de masse haute résolution.

2.1.4.1.1. Colonne LC

Capable d'obtenir des pics de natamycine reproductibles et capable de distinguer les pics de natamycine des pics parasites provenant de la matrice de l'échantillon et/ou des solvants utilisés.

REMARQUE : Les conditions opératoires devront être optimisées en fonction du type de matériel utilisé pour l'analyse.

2.1.4.1.2. Analyse HPLC

La colonne et les paramètres suivants ont été jugés appropriés :

Colonne : Waters Sunfire C18, 150 x 2,1 mm, 3,5 µm

Température de la colonne : 30 °C

Débit : 0,25 ml/min

Volume d'injection : 20 µL

Phase mobile A : Eau:acide acétique, 97:3 (v/v) (2.1.3.3.6)

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Phase mobile B : Méthanol:acide acétique, 97:3 (v/v) (2.1.3.3.5)
Temps : 30 mn

Plateau de l'échantillonneur automatique: 8 °C
Gradient :

Temps (mn)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)
0	90	10
25	10	90
27	10	90
27.1	90	10
30	90	10

2.1.4.2. Détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HR/MS)

1. Mode d'ionisation : électrospray positif
2. Résolution de masse : m/z/□m/z
3. Cible AGC : Plage dynamique étendue
4. Temps d'injection max. : 50 ms
5. Plage de balayage : m/z 480-670
6. Gaz de balayage : 60 L/min
7. Gaz auxiliaire : 5 L/min
8. Tension de pulvérisation : 3,75 V
9. Natamycine : m/z 666.31069 $[M+H]^+$. ion de confirmation m/z 503.22672
10. Temps de rétention : 16,5 min

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

2.1.5. PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE

Les échantillons doivent être agités pour assurer leur homogénéité avant de procéder au sous-échantillonnage.

2.1.5.1. Tamisage

Pour chaque vin, introduire à la pipette 2 ml d'échantillon dans deux tubes de centrifugation Eppendorf de 2 ml. Ajouter respectivement 0 µl et 20 µl de solution de travail n°2 de natamycine à 0,5 µg/ml (2.1.3.3.3) dans les tubes. Ceci équivaut à un ajout de 0 µg/l et 5 µg/l de natamycine. Agiter les tubes pendant une minute, puis centrifuger à 14 000 t/mn pendant 10 mn. Filtrer une partie aliquote sur un filtre en PTFE de 0,2 µm dans un tube ambré de 2 ml. Analyser par LC-HR/MS (section 2.1.6) et évaluer la concentration de natamycine dans l'échantillon (section 2.1.7).

Si la concentration estimée de natamycine est inférieure à 5 µg/l, indiquer pour résultats < 5 µg/l. Si la concentration estimée de natamycine est supérieure à 5 µg/l, procéder comme indiqué à la section 2.1.5.2.

2.1.5.2. Quantification

Détermination de la natamycine dans des échantillons dont la concentration estimée est supérieure à 5 µg/l. Introduire à la pipette 2 ml de vin dans cinq tubes pour centrifugation Eppendorf de 2 ml et ajouter respectivement 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl et 50 µl de solution de travail n°1 de natamycine (2.1.3.3.2) dans les tubes. Ceci équivaut à un ajout de 0 µg/l, 25 µg/l, 50 µg/l, 100 µg/l et 250 µg/l de natamycine. Agiter les tubes pendant une minute, puis centrifuger à 14 000 t/mn pendant 10 mn. Filtrer une partie aliquote sur un filtre en PTFE de 0,2 µm dans un tube ambré de 2 ml. Analyser par LC-HR/MS (section 2.1.6) et évaluer la concentration de natamycine dans l'échantillon (section 2.1.7).

2.1.6. ANALYSE

REMARQUE : Au début des mesures, contrôler la stabilité de la ligne de base et la linéarité des réponses du détecteur, et vérifier la limite de détection. Maintenir les mêmes conditions opératoires lors de la mesure de tous les échantillons et des solutions étalons. Identifier les pics de natamycine sur la base du temps de rétention et de leur canal de masse précis, et mesurer l'aire des pics. Injecter chacune des solutions préparées dans la colonne LC. Mesurer l'aire des pics de natamycine dans chacun des canaux de quantification et de confirmation. Un exemple de chromatogramme typique est présenté en Figure 1.

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

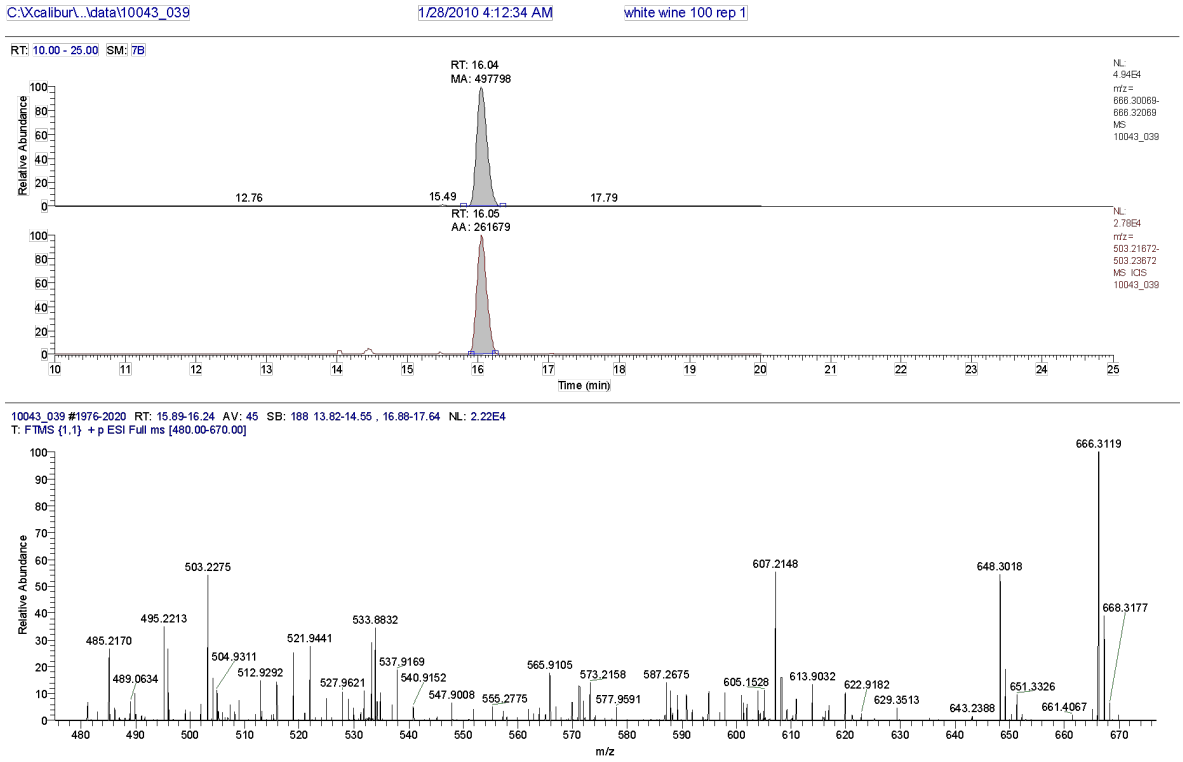


Figure 1. Chromatogramme LC-HR/MS typique et spectre de masse de la natamycine, dans un échantillon de vin blanc dopé en natamycine à une concentration équivalant à 50 µg/l.

Tracer l'aire des pics du principal canal de quantification en fonction de la concentration de natamycine ajoutée en microgrammes par litre (µg/l). Déterminer la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation de la droite de régression. La courbe d'étalonnage doit être rectiligne et le coefficient de corrélation doit être au moins de 0,99.

2.1.7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

2.1.7.1. Calcul du niveau d'analyte

La concentration de natamycine dans l'échantillon, en microgrammes par litre (µg/l) est calculée en appliquant la formule suivante :

$C = b/a$

où C = concentration de natamycine dans le vin (µg/l), a = pente de la droite de régression, b = y – ordonnée à l'origine de la droite de régression

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

2.1.8. CONFIRMATION

La présence de la natamycine dans les échantillons doit être confirmée en appliquant les critères suivants :

Présence d'un pic dans les deux canaux de masse précis *m/z* 666.31069 et *m/z* 503.22672 au même temps de rétention. Calculer le ratio de l'aire des pics du principal canal de quantification de la masse par rapport à l'aire des pics du canal de confirmation. Le critère est que ce ratio concorde à ±25 % avec ceux obtenus avec la méthode des ajouts dosés de solutions étalons.

2.1.9. DONNÉES DE PERFORMANCE DE LA MÉTHODE

2.1.9.1. Linéarité

La méthode est linéaire sur toute la gamme d'étalonnage de 1 à 2 640 µg/l dans des matrices solvant, vin blanc et vin rouge (figures 2, 3 et 4).

Figure 2. Graphique d'étalonnage à dix points d'ajout de natamycine dans le solvant, dans la plage allant de 1 à 2 600 µg/l.

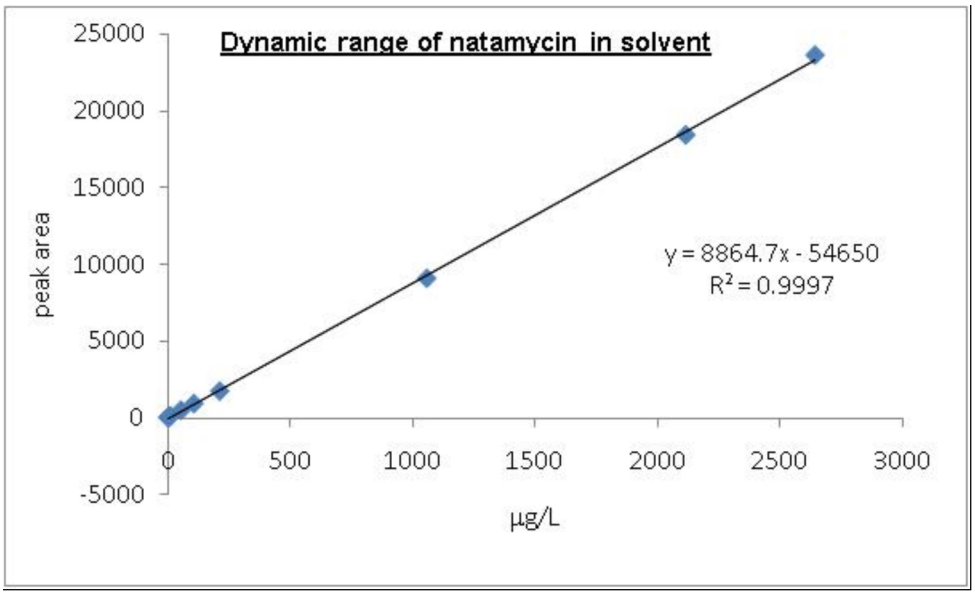


Table 1. Résidus d'étalonnage dans le solvant

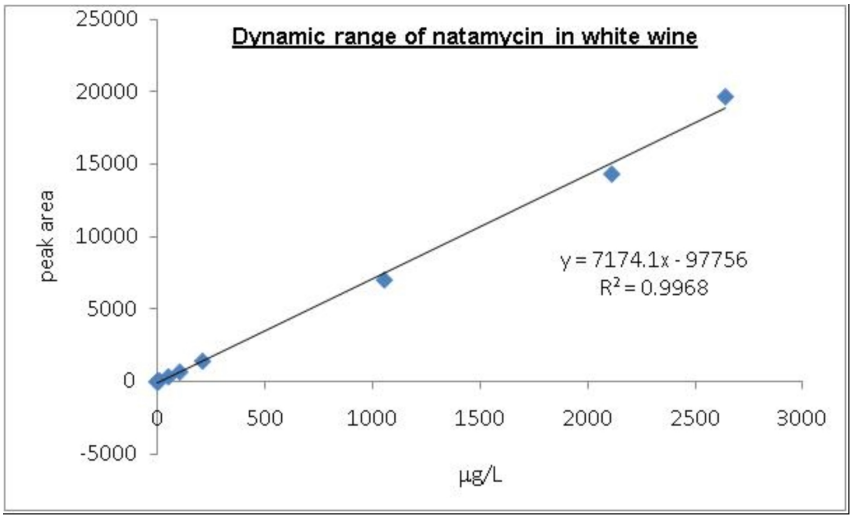
Natamycine	Conc. prévue		

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

(µg/l)	(µg/l)	Résidus	Résidus d'étalon
0	6,4	-6,4	-0,4
1,056	6,8	-5,7	-0,3
5,28	10,9	-5,6	-0,3
10,56	16,8	-6,3	-0,4
52,8	58,9	-6,1	-0,3
105,6	108,3	-2,7	-0,2
211,2	200,1	11,1	0,6
1056	1029,8	26,2	1,5
2112	2084,8	27,2	1,6
2640	2671,8	-31,8	-1,8

Figure 3. Graphique d'étalonnage à dix points d'ajout de natamycine dans le vin blanc, dans la plage allant de 1 à 2 600 µg/l.



Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Tableau 2 Résidus d'étalonnage dans la matrice vin blanc

Natamycine (µg/l)	Conc. prévue (µg/l)	Résidus	Résidus d'étalon
0	15.5	-15.5	-0.3
1.056	15.6	-14.6	-0.3
5.28	18.8	-13.5	-0.2
10.56	23.9	-13.3	-0.2
52.8	63.6	-10.8	-0.2
105.6	109.3	-3.7	-0.1
211.2	212.8	-1.6	0.0
1056	989.0	67.0	1.2
2112	2003.2	108.8	2.0
2640	2742.7	-102.7	-1.8

Figure 4. Graphique d'étalonnage à dix points d'ajout de natamycine dans le vin rouge, dans la plage allant de 1 à 2 600 µg/l.

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

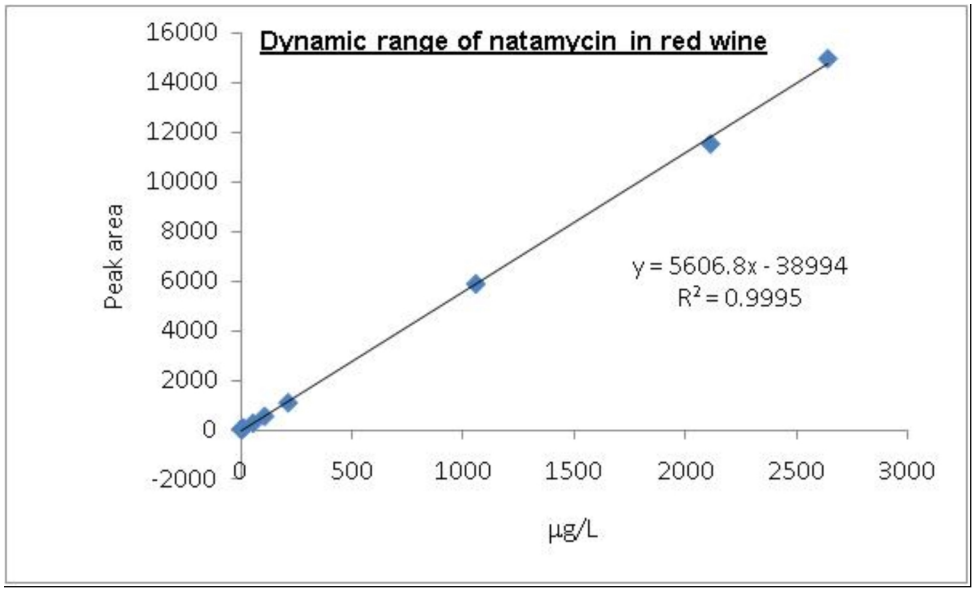


Tableau 3 Résidus d'étalonnage dans la matrice vin rouge.

Natamycine (µg/l)	Conc. prévue (µg/l)	Résidus	Résidus d'étalon
0	7,2	-7,2	-0,3
1,056	8,2	-7,1	-0,3
5,28	10,9	-5,7	-0,3
10,56	16,8	-6,2	-0,3
52,8	52,1	0,7	0,0
105,6	102,1	3,5	0,2
211,2	199,8	11,4	0,5
1056	1055,2	0,8	0,0

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

2112	2063,7	48,3	2,3
2640	2678,4	-38,4	-1,8

2.1.9.2. Exactitude et Précision

La répétabilité de la méthode a été évaluée à la limite d'intervention de 5 µg/l et à 200 µg/l, dans des matrices solvant, vin blanc et vin rouge (tableaux 4, 5 et 6). L'exactitude a été évaluée par enrichissement du vin blanc et du vin rouge avec une quantité connue de natamycine, à deux niveaux différents. L'analyse a ensuite été effectuée par un second analyste ignorant la concentration de la natamycine ajoutée. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 4. Répétabilité de la natamycine ajoutée dans le solvant (méthanol:eau:acide acétique, 50:47:3 v/v) à deux concentrations différentes : 5 et 200 µg/l.

	Conc. de Natamycine ug/l	**Extraction (%)**
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 1	5,3	99,7
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 2	5,4	101,8
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 3	5,8	108,6
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 4	5,7	108,2
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 5	5,8	109,0
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 6	5,9	112,2

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Solvant étalon à 5 ng/ml rép 7	5,7	108,4
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 8	6,4	120,2
Moyenne	5,8	108,5
Écart-type	0,3	6,2
RSD (%)	5,7	5,7
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 1	238,3	112,9
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 2	237,1	112,4
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 3	231,5	109,7
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 4	228,0	108,1
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 5	244,0	115,7
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 6	220,7	104,6
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 7	229,4	108,7
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 8	251,7	119,3

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Moyenne	235,1	111,4
Écart-type	9,8	4,7
RSD (%)	4,2	4,2

Tableau 5. Répétabilité de la natamycine ajoutée dans le vin blanc à deux concentrations différentes, 5 et 200 µg/l.

	Conc. de Natamycine ug/l	**Extraction (%)**
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 1	5,3	99,1
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 2	4,4	82,8
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 3	5,1	96,0
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 4	4,9	92,5
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 5	4,6	86,4
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 6	5,1	96,4
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 7	4,8	90,9
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 8	4,9	92,2
Moyenne	4,9	92,0
Écart-type	0,3	5,4

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

RSD (%)	5,9	5,9
Vin blanc à 211 ng/ml rép 1	217,6	103,1
Vin blanc à 211 ng/ml rép 2	223,3	105,8
Vin blanc à 211 ng/ml rép 3	213,0	101,0
Vin blanc à 211 ng/ml rép 4	216,8	102,7
Vin blanc à 211 ng/ml rép 5	211,4	100,2
Vin blanc à 211 ng/ml rép 6	208,6	98,9
Vin blanc à 211 ng/ml rép 7	204,2	96,8
Vin blanc à 211 ng/ml rép 8	214,4	101,6
Moyenne	213,7	101,3
Écart-type	5,8	2,8
RSD (%)	2,7	2,7

Tableau 6. Répétabilité de la natamycine ajoutée dans le vin rouge à deux concentrations différentes, 5 et 200 µg/l.

	Conc. de Natamycine ug/l	**Extraction (%)**
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 1	5,3	99,7

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 2	5,0	93,8
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 3	3,8	72,5
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 4	5,1	96,5
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 5	5,0	95,0
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 6	5,5	103,5
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 7	4,3	80,9
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 8	4,8	90,7
Moyenne	4,9	91,6
Écart-type	0,5	10,2
RSD (%)	11,1	11,1
Vin rouge à 211 ng/ml rép 1	183,9	87,1
Vin rouge à 211 ng/ml rép 2	178,4	84,5
Vin rouge à 211 ng/ml rép 3	181,1	85,8
Vin rouge à 211 ng/ml rép 4	197,5	93,6
Vin rouge à 211 ng/ml rép 5	178,2	84,5
Vin rouge à 211 ng/ml rép 6	184,2	87,3
Vin rouge à 211 ng/ml rép 7	181,2	85,9
Vin rouge à 211 ng/ml rép 8	171,3	81,2

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Moyenne	182,0	86,2
Écart-type	7,5	3,6
RSD (%)	4,1	4,1

Tableau 7. Exactitude de la natamycine ajoutée dans le vin blanc et le vin rouge à deux concentrations différentes, 125 et 220 µg/l.

	Concentration théorique (µg/l)	**Concentration obtenue (µg/l)**	**Exactitude (%)**	**Ecart réduit**
Vin blanc A rép 1	125	135	108	0,50
Vin blanc A rép 2	125	142	114	0,85
Vin blanc A rép 3	125	138	110	0,65
Vin blanc B rép 1	220	230	105	0,28
Vin blanc B rép 2	220	230	105	0,28
Vin blanc B rép 3	220	239	109	0,54
Vin rouge A rép 1	220	213	97	-0,20

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Vin rouge A rép 2	220	234	106	0,40
Vin rouge A rép 3	220	223	101	0,09
Vin rouge B rép 1	125	129	103	0,20
Vin rouge B rép 2	125	129	103	0,20
Vin rouge B rép 3	125	120	96	-0,25

1. Calculs

Écart réduit calculé comme suit :

= (concentration obtenue – concentration theorique)/ écart-type cible

Où :

Écart-type cible = 0,16 x concentration ajoutée

c.-à-d. selon Horwitz

2.2. Détermination de la natamycine (pimaricine) dans le vin par HPLC/DAD

2.2.1. Objet

Cette méthode décrit une méthode d'analyse pour la détermination de la natamycine (pimaricine) dans le vin par HPLC. Le niveau de la natamycine est exprimé en microgrammes par litre (µg/l) de vin.

La méthode décrite a été validée en laboratoire en prenant en compte l'influence de la matrice vin (ex : vin blanc ou vin rouge).

2.2.2. Principe

Les échantillons de vin tranquille sont directement injectés dans le système HPLC. Les échantillons de vin mousseux sont d'abord dégazés par filtration ou au moyen d'un bain à ultrasons. L'analyte est séparé de la matrice sur une colonne C8. La fenêtre de fractionnement avec l'analyte est automatiquement transférée sur une colonne C18

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

pour poursuivre la séparation. La natamycine est détectée à 304 nm et 319 nm. En outre, le spectre DAD est utilisé pour l'identification. La quantification est effectuée par référence à des étalons externes.

2.2.3. Réactifs et produits

2.2.3.1. Réactifs

2.2.3.1.1. Eau désionisée

2.2.3.1.2. Méthanol, qualité HPLC ***(n° CAS 67-56-1).***

2.2.3.1.3. Acide formique, qualité analytique ***(n° CAS 64-18-6).***

2.2.3.1.4. Acide acétique, qualité analytique ***(n° CAS 64-19-7).***

2.2.3.1.5. Acide chlorhydrique, qualité analytique, 0,1 N ***(n° CAS 7647-01-0).***

2.2.3.1.6. Matrice vin, natamycine non détectable

2.2.3.1.7. Natamycine, > 95 % ***(n° CAS 7681-93-8).***

La pureté est vérifiée par mesure photométrique à 291 nm, 304 nm et 319 nm d'une solution de natamycine dans de l'acide chlorhydrique 0,1 N par rapport à un blanc d'acide chlorhydrique 0,1 N :

Données de référence selon la littérature	291 nm	304 nm	319 nm
Extinction (1 % en masse de natamycine, cellule de 1 cm)	758	1 173	1 070

2.2.3.2. Alternative :

2.2.3.2.1. Après dilution (ex : facteur de dilution de 20) la solution mère (2.1.3.3.1) peut également être utilisée pour la mesure photométrique, par exemple en introduisant à la pipette 1,0 ml de solution mère dans une fiole jaugée de 20 ml et en complétant jusqu'au repère avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Comparer la mesure à celle d'un blanc ayant la même composition de solvants que la solution mère diluée.

2.2.3.3. Préparation de la phase mobile

2.2.3.3.1 Solutions pour la phase mobile :

2.2.3.3.1.1. 5 ml d'acide acétique dans 2 l de méthanol

2.2.3.3.1.2. 5 ml d'acide acétique dans 2 l d'eau désionisée

2.2.3.3.2. Éluant 1 : méthanol-acide acétique / eau désionisée-acide acétique (65 / 35)

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

2.2.3.4.3 Éluant 2 : méthanol-acide acétique / eau désionisée-acide acétique (80 / 20)

2.2.3.4. Préparation de la solution mère et des solutions étalons

Toutesles solutions ont une stabilité limitée et doivent être stockées au froid et à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur. La solution mère (2.1.3.3.1.1) a une durée de stockage de plusieurs semaines, mais sa concentration doit être vérifiée peu de temps avant de l'utiliser (ex : voir la méthode alternative, 2.2.3.1.7). Les dilutions I (2.2.3.3.1.2) et II (2.2.3.3.1.3) ainsi que les solutions étalons (2.2.3.3.2) doivent être préparées chaque jour.

2.2.3.4.1. Préparation de la solution mère et des dilutions

2.2.3.4.1.1. Solution mère (approximativement 100 mg/l)

Peser environ 5 mg de natamycine (2.2.3.1.7) et transférer avec du méthanol dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 0,5 ml d'acide formique, vérifier que toute la natamycine est dissoute, tempérer à 20°C et compléter jusqu'au repère avec du méthanol.

2.2.3.4.1.2. Dilution I (approximativement 5 mg/l)

Introduire à la pipette 2,5 ml de solution mère (2.1.3.3.1) dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter jusqu'au repère avec de l'eau désionisée.

2.2.3.4.1.3. Dilution II (approximativement 1 mg/l)

Introduire à la pipette 4 ml de Dilution I (2.2.3.3.1.2) dans une fiole jaugée de 20 ml et compléter jusqu'au repère avec la matrice vin (2.2.3.1.6).

2.2.3.4.2. Préparation des solutions étalons

Pour les solutions étalons, diluer la Dilution II (2.2.3.3.1.3) aux concentrations désirées avec la matrice vin (2.2.3.1.6) ; par exemple, 50 µl dans une fiole jaugée de 10 ml équivalent à 5 µg/l :

Fiole jaugée	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Volume de Dilution II (µl)	50	100	200	400	500	1000	3700
Quantité de natamycine (µg/l)	5	10	20	40	50	100	370

2.2.4. Appareillage

Matériel de laboratoire courant, notamment :

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

2.2.4.1. Appareils HPLC-DAD avec vanne HPLC 6 ports et deux pompes isocratiques ou une pompe à gradient pour le fractionnement

2.2.4.2. Colonne HPLC RP-8

2.2.4.3. Colonne HPLC RP-18

2.2.4.4. Photomètre

2.2.5. Echantillonnage

Les échantillons de vin tranquille sont directement injectés dans le système HPLC. Les échantillons de vin mousseux sont d'abord dégazés par filtration ou au moyen d'un bain à ultrasons. Si les échantillons doivent être stockés, ils doivent l'être au froid et à l'abri de la lumière.

2.2.6. Procédure

2.2.6.1. Conditions de fonctionnement du système HPLC

La colonne et les paramètres suivants ont été jugés appropriés :

Colonne 1 :Colonne C 8 (ex : Merck Select B 125*4mm/5µm, avec bouchon)

Phase mobile : Éluant 1 (2.2.3.2.2) à température ambiante

Débit : 1 ml/mn

Colonne 2 : Colonne C 18 (ex : Merck Lichrospher 125*4mm/5µm)

Phase mobile : Éluant 2 (2.2.3.2.3) à 30°C

Débit : 1 ml/mn

Volume d'injection : 500 µl

Détection UV :304 nm et 319 nm

Fenêtre de fractionnement : La position de la fenêtre de fractionnement doit être contrôlée avant l'analyse suivante (figure 1). La plage de la fenêtre de fractionnement doit être fixée à 0,5 mn avant et après élution du pic désiré par la colonne C 8.

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

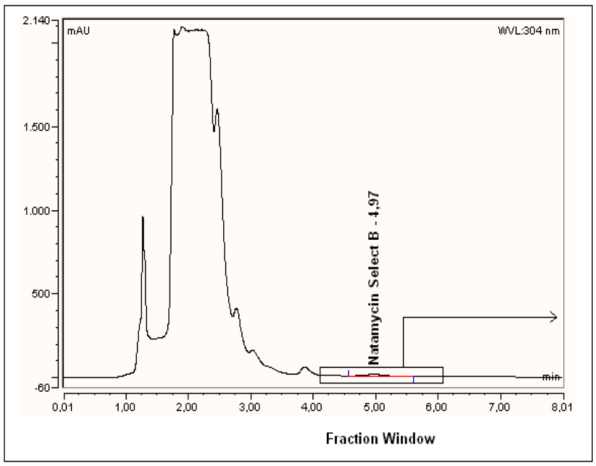


Fig. 1. Colonne 1
Fenêtre de fractionnement

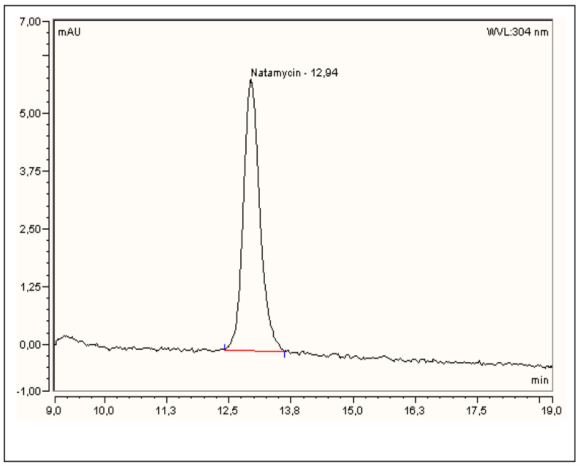


Fig.2. Colonne 2.
Vin blanc dopé en natamycine (50 µg/l)

2.2.6.2. Identification/ Confirmation

L'identification des pics se fait par comparaison des temps de rétention des étalons et des échantillons aux deux longueurs d'onde mesurées 304 nm et 319 nm. Avec le système chromatographique et les paramètres présentés en 2.2.6.1, le temps de rétention de la natamycine est d'environ 12,9 mn (fig. 2).

Le spectre DAD est utilisé pour la confirmation des résultats positifs (fig. 3 et fig. 4).

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

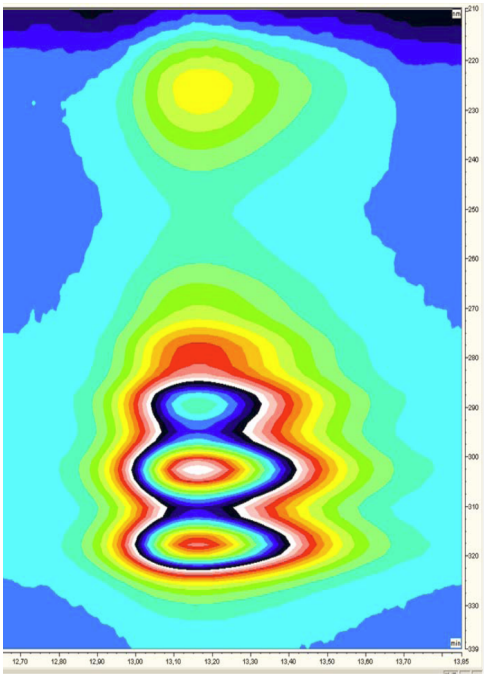


Fig. 3 Spectres DAD de la natamycine en 3D

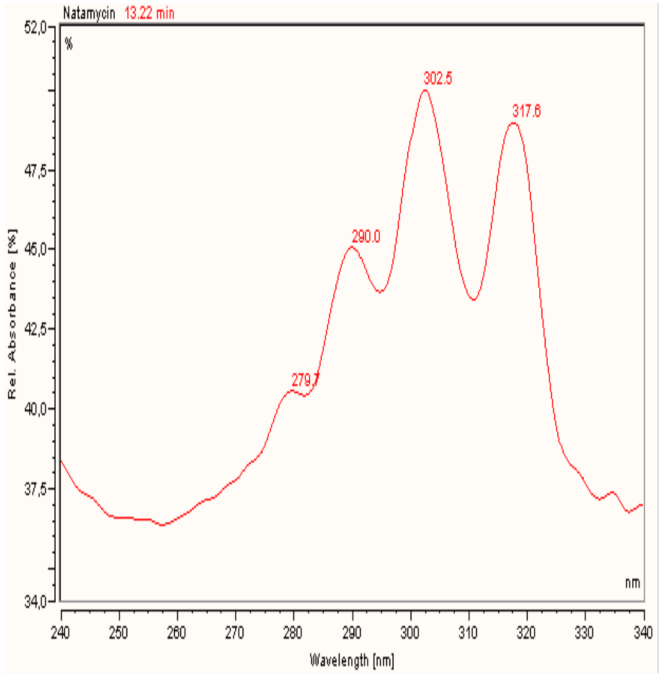


Fig. 4 Spectres DAD de la natamycine

2.2.7. Calculs et expression des résultats

Une courbe d'étalonnage des solutions étalons (2.2.3.3.2) est préparée à l'aide des chromatogrammes mesurés à 304 nm. La quantification de la natamycine est réalisée selon la méthode de l'étalonnage externe. Une courbe d'étalonnage linéaire est générée en comparant les aires des pics et les concentrations correspondantes. Le coefficient de corrélation doit être au moins de 0,99.

Les résultats sont exprimés en µg/l.

2.2.8. Données de performance de la méthode

Limite de détection, limite de quantification

La limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées selon la norme DIN 32645 (détermination directe : mesures multiples d'un blanc d'échantillon matrice, n = 10, et courbe d'étalonnage couvrant tout le domaine de mesure).

Limite de détection : 2,5 µg/l

Limite de quantification : 8,5 µg/l

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Linéarité

La linéarité dans la matrice vin est confirmée dans la gamme d'étalonnage allant de 5 µg/l à 100 µg/l (fig. 5).

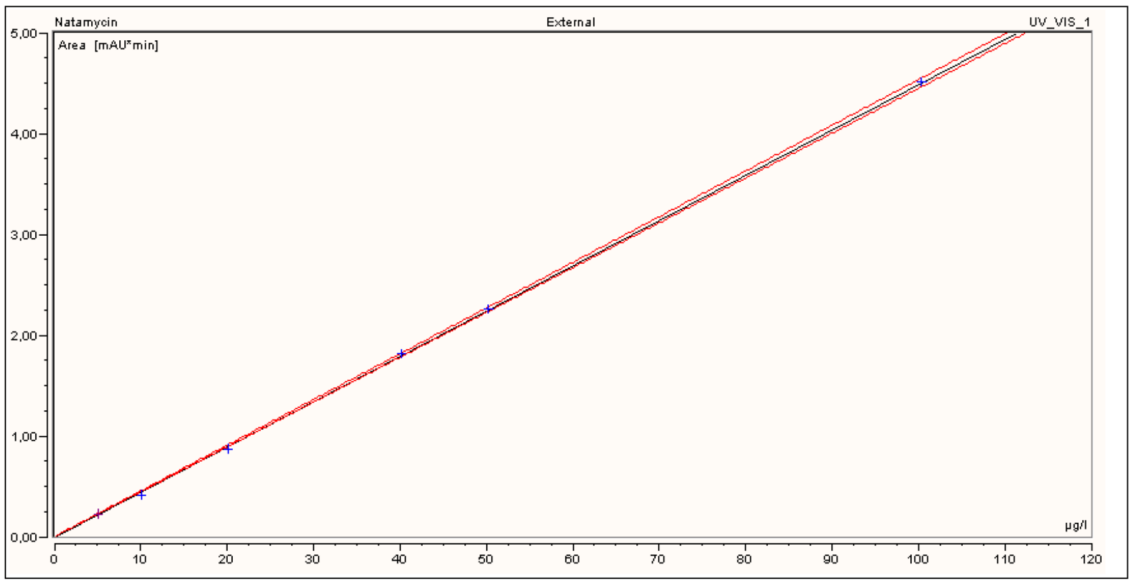


Figure 5. Graphique d'étalonnage à six points d'ajout de natamycine dans le vin blanc, dans la plage allant de 5 à 100 µg/l, R2=0,9999.

2.2.9. Exactitude et précision

L'exactitude et la répétabilité ont été évaluées par enrichissement de vins blanc, rosé et rouge avec une quantité connue de natamycine et en mesurant chacun de ces échantillons à cinq reprises. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Matrice	Teneur en natamycine dans la matrice (µg/l)	Teneur en natamycine ajoutée (µg/l	Teneur en natamycine mesurée (µg/l)	Taux d'extraction (%)	Écart réduit

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Vin blanc	n. d.	5,02	5,04	100,4	0,0
			4,70	93,6	-0,2
			5,12	102,0	0,1
			5,29	105,4	0,2
			4,97	99,0	0,0
		Moyenne	**5,02**	**100,1**	
		Écart type	**0,22**		
		RSD (%)	**4,3**		
		Répétabilité r	**0,85**		
Vin rosé	n. d.	5,02	4,79	95,4	-0,1
			4,83	96,2	-0,1
			4,76	94,8	-0,1
			4,79	95,4	-0,1
			4,73	94,2	-0,2
		Moyenne	**4,78**	**95,2**	
		Ecart type	**0,04**		
		RSD (%)	**0,78**		
		Répétabilité r	**0,15**		

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Vin rouge	n. d.	5,02	4,61	91,8	-0,2
			4,65	92,6	-0,2
			4,89	97,4	-0,1
			4,67	93,0	-0,2
			4,34	86,5	-0,4
		Moyenne	**4,63**	**92,3**	
		Écart type	**0,20**		
		RSD (%)	**4,2**		
		Répétabilité r	**0,77**		
Vin rouge	n. d.	21,2	19,73	93,1	-0,2
			20,66	97,5	-0,1
			21,16	99,8	0,0
			19,73	93,1	-0,2
			19,58	92,4	-0,3
		Moyenne	**20,17**	**95,2**	
		Écart type	**0,70**		
		RSD (%)	**3,5**		
		Répétabilité r	**2,7**		

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

Vin rouge	n.d.	53,2	51,84	97,4	-0,1
			51,91	97,6	-0,1
			51,42	96,7	-0,1
			50,12	94,2	-0,2
			50,62	95,2	-0,2
		Moyenne	**51,18**	**96,2**	
		Écart type	**0,78**		
		RSD (%)	**1,5**		
		Répétabilité r	**3,1**		

Table 1 Exactitude de la natamycine ajoutée dans le vin blanc, le rosé et le vin rouge ; n.d. « non détecté » ; limite de détection 2,5 µg/l

Calculs (Tableau 1) :

Répétabilité r = écart type * $t_{4;0,95}$ * $2^{1/2}$

Écart réduit = (tenur en natamicine mesurée – teneur en natamicine ajoutée)/ écart-type cible *

* selon Horwitz

écart-type cible = 1/100 * quantité ajoutée * $2^{(1 - 0,5 \log \text{quantité ajoutée})}$

Références

1. DIN 32645:2008-11

2. UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe, Editio Cantor Aulendorf, 1978, Herausgeber/ Editior Hans-Werner Dibbern in Zusammenarbeit mit E. Wirbitzki

3. Macarthur R, Feinberg M, Bertheau Y, 2010, Construction of measurement uncertainty profiles for quantitative analysis of genetically modified organisms

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012

based on interlaboratory validation data, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 93(3), 1046 – 1056.

4. FV 1351. Dominic Roberts and Adrian Charlton. Determination of natamycin in wine by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: standard operating procedure and method performance data. OIV SCMA mars 2010.
5. FV 1355. Tomasz Brzezina. Natamycin in Wein. OIV SCMA mars 2010.

Exemplaire certifié conforme Izmir, 22 juin 2012
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2012