RÉSOLUTION OIV-OENO 349-2011

COMPLEMENT A LA METHODE DE DETERMINATION DE L'OCHRATOXINE A PAR COLONNE D'IMMUNO-AFFINITE OENO 16/2001

L'ASSEMBLEE GENERALE,

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 ;

CONSIDERANT les travaux de la Sous-Commission des méthodes d'analyse de l'OIV ;

CONSIDERANT la résolution Oeno 16/2001 relative au dosage de l'Ochratoxine A dans le vin après passage sur colonne d'immun affinité et HPLC avec détection fluorimétrique

CONSIDERANT la nécessité de compléter cette méthode en précisant en particulier les points critiques a prendre en considération

DECIDE : de compléter la résolution Oeno 16/2001 figurant dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts par les points suivants :

Point 3 de la méthode « REACTIFS » est réorganisé comme suit :

3. Réactifs

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 de se conformer à leurs prescriptions.

3.1.1. Hydrogénophosphate de disodium dihydraté ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) CAS [10028-24-7]

3.1.2. Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) CAS [10049-21-5]

3.1.3. Chlorure de sodium (NaCl) CAS [7647-14-5]

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

3.1.5. Tampon PB (solution de dilution)

Dissoudre 60 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

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

d'eau et compléter à 1 litre avec de l'eau.

3.1.6. Tampon PBS (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 8.7 g de NaCl (3.1.3) dans 950 ml d'eau et compléter à 1 litre avec de l'eau.

3.1.7. Méthanol (CH_3OH) CAS [67-56-1]

3.2. Réactifs pour HPLC

3.2.1. Acétonitrile qualité HPLC (CH_3CN) CAS [75-05-8]

3.2.2. Acide acétique glacial (CH_3COOH) CAS [64-19-7]

3.2.3. Phase mobile HPLC : eau : acétonitrile : acide acétique glacial, 99:99:2, v/v/v

Mélanger 990 ml d'eau avec 990 ml d'acétonitrile (3.2.2) et 20 ml d'acide acétique glacial (3.2.3). En cas de présence de composés non solubilisés, filtrer sur filtre 0.45 µm. Dégazer (par exemple avec hélium) sauf si le matériel HPLC utilisé comporte un étage de dégazage.

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

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

3.3.2. Mélange de solvants (Toluène: acide acétique glacial, 99:1, v/v).

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

Les points 3.13 et 3.14 restent inchangés mais leur numérotation est adaptée en 3.4 et 3.5.

Point 7 de la méthode « CALCULS » est modifié comme suit :

Dans la formule le chiffre « 2 » est remplacé par « F » le facteur de dilution.

L'annexe suivante relative aux points critiques de la méthode est ajoutée à la méthode

ANNEXE

Guide concernant les points critiques de la méthode de détermination de l'Ochratoxine A par colonne d'immuno-affinité 16/2001, de type II.

Les points critiques a prendre en considération sont listés ci-après à titre indicatif et constituent un guide d'application de la méthode. La numérotation se rapporte aux paragraphes de la résolution originale.

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

1. Domaine d'application

A titre indicatif la méthode peut s'appliquer aux moûts de raisins, moûts de raisin partiellement fermentés et aux vins nouveaux encore en fermentation. Les paramètres de validation ne concernent que les vins.

2. Principe

La méthode se décompose en deux étapes distinctes. La première est une étape de purification et de concentration de l'OTA présente dans le vin ou le moût par fixation sur colonne d'immunoaffinité puis élution. La seconde est une étape de quantification pratiquée sur l'éluat par HPLC avec détection fluorimétrique.

3. Réactifs

3.13. Solution mère d'OTA

L'utilisation d'OTA sous forme solide est déconseillée; utiliser de préférence une solution standard d'OTA (point 3.14)

3.14. Solution standard d'OTA

Utilisation de solution du commerce dont la concentration (env 50 µg/ml) est raccordée et fait l'objet d'un certificat d'analyse mentionnant valeur de référence et incertitude sur la concentration

En principe ces solutions ne sont pas certifiées en volumétrie, et doivent être prélevées avec du matériel de pipetage raccordé, pour constituer des solutions mères allant de 0.25 à 1 mg/L dans l'éthanol pur ou dans la phase mobile de la méthode HPLC (3.2.3).

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

4. Appareillage

4.13. RECOMMANDATIONS POUR L'EVALUATION DE LA PERFORMANCE DES COLONNES D'IMMUNOAFFINITE (optionnel)

L'étape de concentration sur colonne d'immunoaffinité constitue une source d'incertitude importante dans la méthode d'analyse. L'expérience a montré que les

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

différentes colonnes proposées sur le marché pouvaient avoir des taux de récupération variant de 70 à 100 %.

Il est donc conseillé de vérifier la performance d'un lot de colonne avant son utilisation. Cette démarche est conseillée en cas de changement de fournisseurs ou de références de colonnes.

4.13.1. Caractérisation du lot de colonnes (mesure du taux de récupération) :

Sélectionner environ 10 colonnes représentatives des types de colonnes utilisées en routine dans le laboratoire, issues de différents numéros de lots. Préparer un même nombre de vins, représentant des matrices différentes, et dont la concentration en OTA est nulle, en effectuant des ajouts dosés x_i variables entre 0.5 et 2 $\mu g \cdot kg^{-1}$. Analyser rapidement après ajouts dosés ces n échantillons avec le lot de colonnes sélectionnées, soit y_i les valeurs trouvées.

On calcule les données concernant le taux de recouvrement qui est la quantité mesurée par rapport à la quantité apportée.

$$t_i = \frac{y_i}{x_i} \ (taux\ de\ recouvrement\ avec\ la\ colonne\ i)$$

$$T = \frac{\sum t_i}{n} \ (taux\ de\ recouvrement\ moyen)$$

$$S_t = \sqrt{\frac{\sum (t_i - T)^2}{n-1}} \ (écart\ type\ du\ taux\ de\ recouvrement)$$

L'écart type du taux de recouvrement ainsi calculé ne représente pas seulement la variabilité des taux de récupération des colonnes, mais inclut également l'incertitude type du système de mesure utilisé en aval des colonnes (HPLC). Il est cependant possible de réaliser une estimation raisonnable de l'écart type du taux de récupération des colonnes seul, en retranchant l'incertitude type du système HPLC à l'erreur de recouvrement calculée:

- Estimer l'incertitude-type S_v (exprimée sous la forme d'un écart type) du système de mesure stricto sensu (sans prendre en compte l'étape du passage sur colonne d'immunoaffinité).

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

Pour cela il est possible d'utiliser une étude de fidélité sur des solutions d'OTA.
L'écart type du taux de récupération S_p est estimé de la façon suivante :

$$S_p = \sqrt{S_t^2 - S_V^2}$$

Pour un domaine de concentration assez large, il est préférable d'exprimer cette grandeur en coefficient de variation de l'écart type (RSDR).
CV% = $S_p \cdot 100$ / concentration de l'ajout

5. Mode opératoire

Le mode opératoire donné dans le point 5 est **indicatif**. La composition des solutions de dilution et de lavage peut être différente en fonction des données du fabricant des colonnes. De même, la concentration de l'échantillon de vin dilué peut être ajustée selon les besoins.

6. Quantification de l'ochratoxine a (ota)

6.1. Courbe de calibration

Préparer, à partir de solutions issues de la dilution de la solution mère avec la phase mobile (3.2.3), une courbe de calibration chaque jour d'analyse ou chaque fois que les conditions chromatographiques changent. Les valeurs choisies doivent encadrer la gamme de travail en prenant en compte le facteur de concentration du vin.

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011