RÉSOLUTION OENO 8/2007

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

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

En vertu de l'Article 2 paragraphe 2 iv de l'accord institutif de l'Organisation internationale de la Vigne et du Vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-commission des méthodes d'analyse et d'évaluation du vin,

DÉCIDE de compléter l'Annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse du vin et du moût avec la méthode de type IV suivante :

Titre	Type de méthode
Dosage du lysozyme dans le vin par chromatographie liquide à haute performance	**IV**

1. Introduction

Il est préférable d'utiliser pour le lysozyme une méthode analytique non basée sur l'activité enzymatique.

2. Champ d'application

Cette méthode permet la quantification du lysozyme (mg de protéine/L) présent dans les vins blancs et rouges indépendamment de l'activité enzymatique (qui pourrait être compromise par une dénaturation partielle ou par des phénomènes de complexation et de coprécipitations) de la matrice.

3. Définition

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) offre une approche analytique basée sur l'interaction de type stérique, polaire ou d'adsorption entre la phase stationnaire et l'analyte et, par conséquent, non liée à l'activité enzymatique

Exemplaire certifié conforme Paris, 15 juin 2007
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2007

réelle de la protéine.

4. Principe

L'analyse s'effectue par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en associant un détecteur spectrophotométrique et un détecteur spectrofluorimétrique. Le contenu inconnu de l'échantillon de vin est calculé en fonction de la surface du pic chromatographique en utilisant la méthodologie de l'étalonnage externe.

5. Réactifs

5.1. Solvants et solutions

Acétonitrile (CH_3CN) pour analyse CLHP

Acide trifluoroacétique (TFA) pur

Eau désionisée pour analyse CLHP

Solution standard : acide tartrique 1g/L, Alcool éthylique 10% v/v ajusté à pH 3,2 avec du tartrate de potassium neutre

5.2. Éluants

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

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

5.3. Solutions de référence

De 1 à 250 mg/L de lysozyme standard dissous dans la solution modèle par agitation continue durant un minimum de 12 heures.

6. Matériel

6.1. Appareil HPLC avec système de pompage prévu pour effectuer un gradient d'élution

6.2. Logement pour colonne thermostatée (four)

6.3. Détecteur spectrophotométrique associé à un détecteur spectrofluorimétrique

6.4. Boucle d'injection , 20 µL

6.5. Colonne polymère à phase inverse avec des groupes fonctionnels phényl (diamètre des pores = 1 000 Å, limite d'exclusion = 1 000 000 Da), Tosoh Bioscience

Exemplaire certifié conforme Paris, 15 juin 2007
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2007

TSK-gel Phényl 5PW RP 7,5 cm x 4,6 mm ID, à titre d'exemple

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

7. Préparation de l'échantillon

Les échantillons de vin sont acidifiés avec du HCl (10 M) dilué au 1/10ème et filtrés avec un filtre en polyamide dont les pores ont un diamètre de 0,22 µm, 5 minutes après l'ajout. L'analyse chromatographique est effectuée immédiatement après la filtration.

8. Conditions opératoires

8.1. Débit d'éluant : 1mL/min

8.2. Température de la colonne : 30°C

8.3. Détection spectrophotométrique : 280 nm

8.4. Détection spectrofluorimétrique : □ ex = 276 nm ; □ em = 345 nm ; Gain = 10

8.5. Programme du gradient d'élution

Temps (min)	Sol A%	Sol B%	gradient
0	100	0	
			isocratique
3	100	0	
			linéaire
10	65	35	
			isocratique
15	65	35	
			linéaire
27	40.5	59.5	

Exemplaire certifié conforme Paris, 15 juin 2007
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2007

			linéaire
29	0	100	
			isocratique
34	0	100	
			linéaire
36	100	0	
			isocratique
40	100	0	

1.1. Temps de rétention moyen du lysozyme : 25,50 minutes

2. Calcul

Les solutions de référence contenant les concentrations suivantes de lysozyme sont analysées en triple : 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 ; 200 ; 250 mg/L. Sur chaque chromatogramme, les aires du pic correspondant au lysozyme sont reportées sur un diagramme en fonction de leurs concentrations respectives afin d'obtenir les droites de régression linéaire exprimées par la formule Y= ax+b. Le coefficient de détermination r^2 devra être > 0,999.

3. Caractéristiques de la méthode

Dans l'objectif d'évaluer l'aptitude de la méthode pour l'objectif formulé, une étude de validation a été réalisée en tenant compte de la linéarité, des limites de détection et de quantification, et de la précision de la méthode. Ce dernier paramètre a été déterminé en définissant le niveau de précision et d'exactitude de la méthode.

Exemplaire certifié conforme Paris, 15 juin 2007
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2007

	Plage de linéarité (mg/L)	Pente de la droite	Coefficient de détermination (r^2)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	Répétabilité (n=5) RSD%			Reproductibilité (n=5) RSD%
						Std[1]	V.R.[2]	V.B.[3]	Std[1]
UV	5-250	3 786	0,9993	1,86	6,20	4,67	5,54	0,62	1,93
FLD	1-250	52 037	0,9990	0,18	0,59	2,61	2,37	0,68	2,30

Tableau 1 : Données relatives aux caractéristiques de la méthode : [1] solution standard ; [2] vin rouge ; [3] vin blanc

3.1. 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 dans le tableau 1.

3.2. Limite de détection et de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été calculées comme le signal équivalant à respectivement 3 fois et 10 fois le bruit de fond chromatographique en conditions de travail sur matrice réelle (tableau 1).

3.3. Précision de la méthode

Les paramètres pris en considération sont la répétabilité et la reproductibilité. Le tableau 1 indique les valeurs de ces paramètres (exprimées comme % d'écart standard de mesures répétées avec différentes concentrations) relevées sur la solution standard, sur vin blanc et sur vin rouge.

3.4. Exactitude de la méthode

Le pourcentage de récupération a été calculé sur les solutions standard contenant 5 et 50 mg/L de lysozyme, additionnées d'une quantité donnée de lysozyme, comme indiqué dans le tableau suivant.

	[C] initial nominal (mg/L)	Ajout (mg/L)	[C] théorique (mg/L)	[C] trouvée (mg/L)	Écart standard	Récupération %
UV 280 nm	50	13,1	63,1	62,3	3,86	99
FD	50	13,1	63,1	64,5	5,36	102

Exemplaire certifié conforme Paris, 15 juin 2007
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2007

UV 280 nm	5	14,4	19,4	17,9	1,49	92,1
FD	5	14,4	19,4	19,0	1,61	97,7

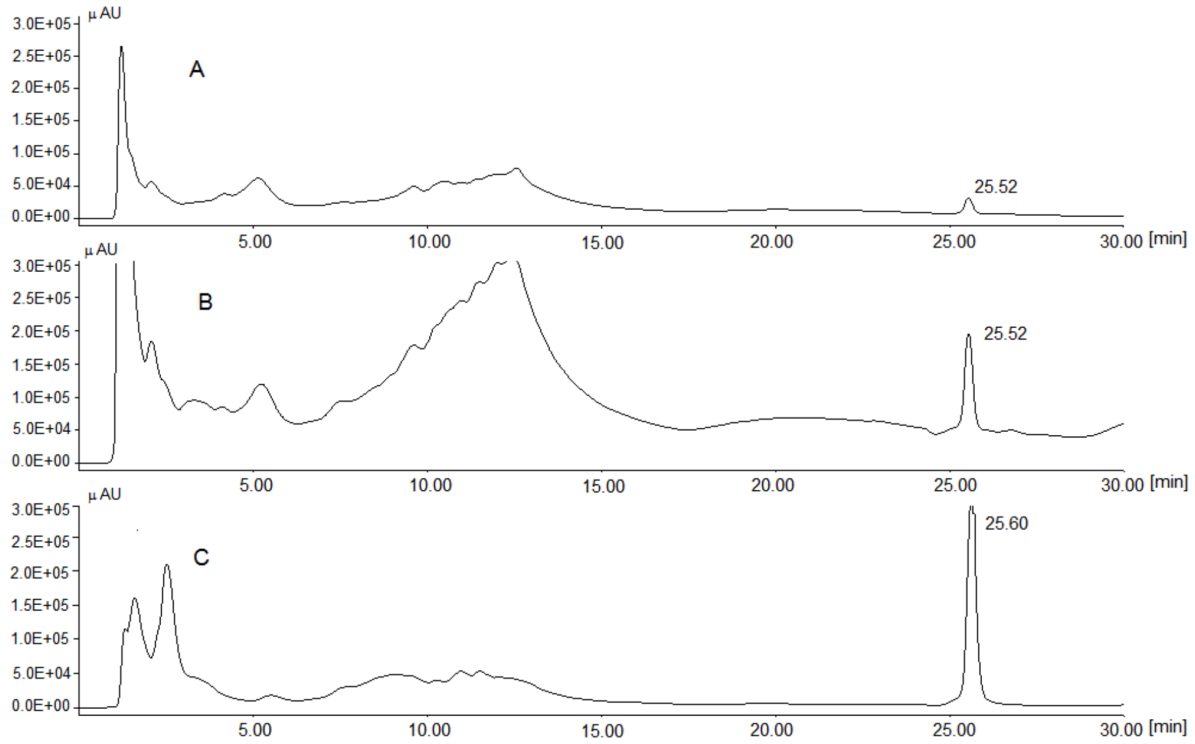


Fig.1 Chromatogramme de vin rouge contenant du Lysozyme pur (une solution standard contenant 1 000 mg/L de Lysozyme a été ajouté au vin pour obtenir une concentration finale de 125 mg/L de Lysozyme). A: détecteur UV à 280 nm; B: détecteur UV à 225 nm; C: détecteur FLD (□ ex 276 nm; □ em 345 nm).

11. Bibliographie

Claudio Riponi; Nadia Natali; Fabio Chinnici. Quantitation of hen's egg white lysozyme in wines by an improved HPLC-FLD analytical method. Am. J. Enol. Vit., in press.

Exemplaire certifié conforme Paris, 15 juin 2007
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2007