RÉSOLUTION OENO 16/2001

DETERMINATION DE L'OCHRATOXINE A PAR COLONNE D'IMMUNO-AFFINITE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

VU l'Article 5, alinéa 4 de la Convention internationale d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins du 13 octobre 1954,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

DECIDE d'introduire dans l'Annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, la méthode suivante:

Dosage de l'ochratoxine A dans le vin après passage sur colonne d'immunoaffinité et CLHP avec détection fluorimétrique

1. Domaine d'application

Ce document décrit une méthode qui s'applique à la détermination de l'ochratoxine A (OTA) dans les vins rouges, rosés et blancs (y compris vins spéciaux) à des concentrations allant jusqu'à 10 µg/l en utilisant une colonne d'immunoaffinité et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) [1].

Cette méthode a été validée lors d'une étude en collaboration internationale qui a consisté à doser l'OTA dans les vins blancs et rouges lors de l'analyse de vins naturellement contaminés et de vins additionnés de toxine à des concentrations allant de 0,01 µg/l à 3,00 µg/l.

La méthode peut s'appliquer aux vins mousseux et vins pétillants, à condition que les échantillons soient préalablement dégazés (par sonication par exemple).

2. Principe

Les échantillons de vins sont dilués avec une solution contenant du polyéthylène glycol et de l'hydrogénocarbonate de sodium puis ils sont filtrés et purifiés sur colonne d'immunoaffinité. L'OTA est éluée avec du méthanol et quantifiée par CLHP en phase inverse avec une détection fluorimétrique.

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

3. Réactifs

Pendant l'analyse, sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs reconnus de qualité pour analyse et de l'eau distillée ou de l'eau ayant la qualité EN ISO 3696. Les solvants doivent être de qualité CLHP.

3.1. Chlorure de sodium (NaCl)

3.2. Hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$)

3.3. Polyéthylène Glycol (PEG 8000)

3.4. Méthanol (CH_3OH)

3.5. Acétonitrile (CH_3CN)

3.6. 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]).

3.7. Acide acétique 85% (CH_3COOH)

3.8. Solution de dilution (1% PEG + 5% $NaHCO_3$)

Dissoudre 10 g de PEG (3.3) et 50 g de $NaHCO_3$ (3.2) dans 950 ml d'eau et compléter à 1 litre avec de l'eau.

3.9. Solution de lavage (2,5% de NaCl + 0,5 % $NaHCO_3$)

Dissoudre 25 g de NaCl (3.1) et 5 g de $NaHCO_3$ (3.2) dans 950 ml d'eau et compléter à 1 litre avec l'eau.

3.10. Phase mobile CLHP (eau:acétonitrile: acide acétique glacial, 99:99:2, v/v/v)

Mélanger 990 ml d'eau avec 990 ml d'acétonitrile (3.5) et 20 ml d'acide acétique glacial (3.7). Filtrer sur filtre 0,45 µm et dégazer (par exemple avec hélium).

3.11. Toluène

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

Mélanger 99 parties en volume de toluène (3.11) avec une partie en volume d'acide acétique glacial (3.7).

3.13. Solution mère d'OTA

Dissoudre 1 mg d'OTA ou le contenu d'une ampoule (si l'OTA a été obtenue sous forme d'une pellicule après évaporation) dans le mélange de solvant (3.12) pour obtenir une solution contenant approximativement 20 à 30 µg/ml d'OTA.

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

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

se servant du mélange du solvant (3.12) comme blanc. Identifier le maximum d'absorption et calculer la concentration d'OTA (*c*) en µg/ml en utilisant l'équation suivante:

- c = A_{max} □ M □ 100 / □ □ □

Dans laquelle:

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

M = masse moléculaire de l'OTA = 403,8 g/mole

□ = coefficient d'extinction molaire de l'OTA dans le mélange de solvant (3.12)

- (□ = 544/mole)

□ = chemin optique (cm)

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

3.14. Solution standard d'OTA (2 µg/ml dans le toluène:acide acétique, 99:1, v/v)

Diluer la solution mère (3.13) avec le mélange de solvants (3.12) pour obtenir une solution standard à la concentration d'OTA de 2 µg/ml.

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

4. Appareillage

Equipement usuel de laboratoire et en particulier le matériel suivant :

4.1. Flacons de verre (4 ml)

4.2. Pompe à vide pour préparer les colonnes d'immunoaffinité.

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

4.4. Filtres en fibre de verre (par exemple Whatman GF/A).

4.5. Colonne d'immunoaffinité spécifique pour l'OTA.

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

4.6. Evaporateur rotatif

4.7. Chromatographe liquide, avec pour la phase mobile, une pompe capable d'atteindre un débit constant de 1ml/mn en isocratique.

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

4.8. Système d'injection, doit être équipé d'une boucle de 100 µl.

4.9. 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 pré-filtre (0,5 µm) contenant une phase convenable. 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.

4.10. 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.

4.11. Système d'acquisition des données

4.12. Spectromètre U.V.

5. MODE OPERATOIRE

5.1. Préparation des échantillons

Verser 10 ml de vin dans un flacon conique de 100 ml. Ajouter 10 ml de la solution de dilution (3.8). Mélanger vigoureusement. Filtrer sur filtre en fibre de verre (4.4) (la filtration est nécessaire pour les solutions troubles ou quand il y a un précipité, après dilution).

5.2. Purification par colonne d'immunoaffinité

Monter la colonne d'immunoaffinité (4.5) à la pompe à vide (4.2), y fixer le réservoir (4.3).

Ajouter 10 ml (équivalent de 5 ml de vin) de la solution diluée dans le réservoir et 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 (3.9) puis avec 5 ml d'eau toujours au débit de 1 à 2 gouttes par seconde.

Sécher la colonne en y faisant passer de l'air. Eluer l'OTA dans le flacon de verre (4.1) avec 2 ml de méthanol (3.4) à la vitesse de 1 goutte par seconde. Evaporer l'éluat à sec à 50° C sous azote. Redissoudre immédiatement dans 250 µl de la phase mobile CLHP (3.10) et stocker à 4° C jusqu'à l'analyse par CLHP.

5.3. Analyse CLHP

Injecter 100 µl de l'extrait reconstitué (équivalent à 2 ml de vin) dans le chromatographe par la boucle d'injection.

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

Conditions opératoires :

Débit: 1 ml /min.

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

Détection fluorimétrique: ongueur d'onde d'excitation = 333 nm

longueur d'onde d'émission = 460 nm

Volume d'injection: 100 µl

6. Quantification de l'Ochratoxine A (OTA)

La quantification de l'OTA devrait être réalisée 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 de calibration.

6.1. Courbe de calibration

Préparer une courbe de calibration chaque jour d'analyse et chaque fois que les conditions chromatographiques changent. Mesurer 0,5 ml de la solution standard d'OTA (3.14) à 2 µg/ml dans un flacon en verre et évaporer le solvant sous azote.

Redissoudre dans 10 ml de phase mobile CLHP (3.10) qui a été filtrée préalablement sur filtre 0,45 µm. Ceci donne une solution d'OTA à 100 ng/ml.

Préparer 5 solutions de calibration CLHP dans 5 flacons de 5 ml jaugés suivant le tableau 1.

Compléter chaque standard à 5 ml avec la phase mobile CLHP (3.10).

Injecter 100 µl de chaque solution dans le CLHP.

Tableau 1

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
µl de phase mobile CLHP filtrée (3.10)	4970	4900	4700	4000	2000
µl de solution d'OTA à 100 ng/ml:	30	100	300	1000	3000
Concentration en OTA (ng/ml)	0,6	2,0	6,0	20	60
OTA injectée (ng)	0,06	0,20	0,60	2,00	6,00

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

NOTE:

1. Si la quantité d'OTA dans les échantillons se situe en dehors de la gamme de calibration, une dilution appropriée sera réalisée ou bien des volumes inférieurs devront être injectés

Dans ces cas, le calcul final (7) doit être reconsidéré au cas par cas.

2. Du fait de la grande variabilité des concentrations, il est recommandé de faire passer la droite de calibration par zéro de façon à avoir une quantification exacte pour les faibles concentrations d'OTA (inférieures à 0,1 µg/l)

7. Calculs

Calculer à partir des courbes de calibration la quantité d'OTA dans la partie aliquote de la solution testée injectée dans la colonne de CLHP.

Calculer la concentration d'OTA (C_{OTA}) en ng/ml (équivalent à µg/l) en utilisant la formule:

$$C_{OTA} = M_A \times 2/V_1 \times V_3/V_2$$

Où:

M_A est la masse d'ochratoxine A (en ng) dans la partie aliquote de matrice injectée sur la colonne et déterminée à partir de la courbe de calibration.

2 est le facteur de dilution

V_1 est le volume d'échantillon à analyser (10 ml)

V_2 est le volume de la solution testée,injectée dans la colonne (100 µl)

V_3 est le volume de solution utilisée pour redissoudre l'éluat sec (250 µl)

8. Performances de la méthode dans le laboratoire

Le tableau 2 regroupe les performances de la méthode appliquée aux vins blancs, rosés, et rouges dans les laboratoires ayant participé à la validation de la méthode.

Tableau 2. Rendement d'extraction à partir de vins surchargés en ochratoxine A à différentes concentrations

	Vin rouge	Vin rosé	Vin blanc

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

Surcharge (µg/l)	Rendement ± SD* (%)	RSD# (%)	Rendement ± SD* (%)	RSD# (%)	Rendement ± SD* (%)	RSD# (%)
0,04	96,7 ± 2,2	2,3	94,1 ± 6,1	6,5	91,6 ± 8,9	9,7
0,1	90,8 ± 2,6	2,9	89,9 ± 1,0	1,1	88,4 ± 0,2	0,2
0,2	91,3 ± 0,6	0,7	88,9 ± 2,1	2,4	95,1 ± 2,4	2,5
0,5	92,3 ± 0,4	0,5	91,6 ± 0,4	0,4	93,0 ± 0,2	0,2
1,0	97,8 ± 2,6	2,6	103,6 ± 2,5	2,5	100,7 ± 1,0	1,0
2,0	96,5 ± 1,6	1,7	98,6 ± 1,8	1,8	98,0 ± 1,5	1,5
5,0	88,1 ± 1,3	1,5	-	-	-	-
10,0	88,9 ± 0,6	0,7	-	-	-	-
Moyenne des moyennes	92,8 ± 3,5	3,8	94,5 ± 5,2	5,5	94,5 ± 4,1	4,3

* SD = Ecart-type (Standard deviation) (n = 3 replicats) ;

RSD = Ecart-type relatif (Coefficient de variation).

9. Travail de Collaboration

La méthode a été validée par une étude collaborative avec la participation de 16 laboratoires répartis dans 8 pays, suivant les recommandations du protocole harmonisé pour la validation des méthodes d'analyse **[2]**. Chaque participant a analysé 10 vins blancs, 10 vins rouges, représentant 5 vins dupliqués en aveugle naturellement contaminés ou surchargés. Les performances de la méthode qui résultent de ce travail sont rapportées dans les annexes I et II

10. LABORATOIRES PARTICIPANTS

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

Unione Italiana Vini, Verona	ITALIE
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti	ITALIE
Istituto Tecnico Agraria, S. Michele all'Adige (TN)	ITALIE
Università Cattolica, Piacenza	ITALIE
Institute for Health and Consumer Protection, JRC – Ispra	ITALIE
Neotron s.r.l., S. Maria di Mugnano (MO)	ITALIE
Chemical Control s.r.l., Madonna dell'Olmo (CN)	ITALIE
Laboratoire Toxicologie Hygiène Appliquée, Université V.	FRANCE
Segalen, Bordeaux	FRANCE
Laboratoire de la D.G.C.C.R.F. de Bordeaux, Talence	SUEDE
National Food Administration, Uppsala	SUEDE
Systembolagets Laboratorium, Haninge	ALLEMAGNE
Chemisches Untersuchungsamt, Trier	CHYPRE
State General Laboratory, Nicosia	FINLANDE
Finnish Customs Laboratory, Espoo	ROYAUME-UNI
Central Science Laboratory, York	ETATS-UNIS
E.T.S. Laboratories, St. Helena, CA	

11. References

1. A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 864 (1999) 89-101
2. AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51.

ANNEXE I

Les données suivantes sont obtenues dans un test inter-laboratoire selon les recommandations du protocole harmonisé pour les études collaboratives en vue de valider une méthode d'analyse.

VIN BLANC		Surcharge en OTA (µg/l)			
Echantillon	Blanc	0,100	1,100	2,000	n.c.

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

Année du test inter-laboratoire	1999	1999	1999	1999	1999
Nombre de laboratoires	16	16	16	16	16
Nombre de laboratoires retenus après élimination des valeurs aberrantes	14*	13*	14	14	15
Nombre of laboratoires éliminés	-	1	2	2	1
Nombre de résultats acceptés	28	26	28	28	30
Valeur moyenne (µg/l)	<0,01	0,102	1,000	1,768	0,283
Ecart-type/Répétabilité s_r (µg/l)	-	0,01	0,07	0,15	0,03
Ecart-type relatif (Coefficient de variation) /Répétabilité RSD_r (%)	-	10,0	6,6	8,5	10,6
Limite de répétabilité r (µg/l)	-	0,028	0,196	0,420	0,084
Ecart-type/Reproductibilité s_R (µg/l)	-	0,01	0,14	0,23	0,04
Ecart-type relatif (Coefficient de variation) /Reproductibilité RSD_R (%)	-	14,0	13,6	13,3	14,9
Limite de Reproductibilité R (µg/l)	-	0,028	0,392	0,644	0,112
Rendement d'extraction %	-	101,7	90,9	88,4	-

** 2 laboratoires ont été exclus de l'évaluation statistique à cause de la limite de détection élevée (= 0,2 µg/l).*

n.c. = échantillon naturellement contaminé

ANNEXE II

Les données suivantes sont obtenues dans un test inter-laboratoire selon les recommandations du protocole harmonisé pour les études collaboratives en vue de valider une méthode d'analyse.

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001

VIN ROUGE		Surcharge en OTA (µg/l)			
Echantillons	Blanc	0,200	0,900	3,000	n.c.
• *Année du test inter laboratoire*	1999	1999	1999	1999	1999
Nombre de laboratoires	15	15	15	15	15
Nombre de laboratoires retenus après élimination des valeurs aberrantes	14*	12*	14	15	14
Nombre de laboratoires éliminés	-	2	1	-	1
Nombre de résultats acceptés	28	24	28	30	28
Valeurs moyennes (µg/l)	<0,01	0,187	0,814	2,537	1,693
Ecart-type/Répétabilité s_r (µg/l)	-	0,01	0,08	0,23	0,19
Ecart-type relatif (Coefficient de variation) /Répétabilité RSD_r (%)	-	5,5	9,9	8,9	10,9
Limite de Répétabilité r (µg/l)	-	0,028	0,224	0,644	0,532
Ecart-type/Reproductibilité s_R (µg/l)	-	0,02	0,10	0,34	0,23
Ecart-type relatif (Coefficient de variation) /Reproductibilité RSD_R (%)	-	9,9	12,5	13,4	13,4
Limite de Reproductibilité R (µg/l)	-	0,056	0,280	0,952	0,644
Rendement d'extraction %	-	93,4	90,4	84,6	-

** 1 laboratoire a été exclu de l'évaluation statistique à cause de la limite de détection élevée (= 0,2 µg/l).*

n.c. = échantillon naturellement contaminé

Exemplaire certifié conforme Adelaide, 17 octobre 2001
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DuTRUC-ROSSET

© OIV 2001