RISOLUZIONE OIV-OENO 662A-2022

DOSAGGIO DELL'OCRATOSSINA A NEL SUCCO D'UVA, NEL SUCCO D'UVA RICOSTITUITO, NEL SUCCO D'UVA CONCENTRATO E NEL NETTARE D'UVA, DOPO IL PASSAGGIO ATTRAVERSO UNA COLONNA DI IMMUNOAFFINITÀ E CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI CON RIVELATORE A FLUORESCENZA

L'ASSEMBLEA GENERALE,

VISTO l'articolo 2, paragrafo iv, dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

SU PROPOSTA della Sottocommissione "Metodi di analisi",

DECIDE di aggiungere il metodo seguente:

Dosaggio dell'ocratossina A nel succo d'uva, nel succo d'uva ricostituito, nel succo d'uva concentrato e nel nettare d'uva, dopo il passaggio attraverso una colonna di immunoaffinità e cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelatore a fluorescenza

Metodo di Tipo IV

Per il succo d'uva, il succo d'uva ricostituito e il nettare d'uva: applicare il Metodo OIV-MA-AS315-10 della *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti.*

Per il succo d'uva concentrato: diluire il succo 5 volte (m/m) con acqua, prima di iniziare il procedimento (punto 5.1). Tenere conto di tale diluizione per calcolare la concentrazione finale di OTA (punto 7) utilizzando la seguente equazione:

$$C_{OTA} = MA \times F/V1 \times V3/V2$$

dove F rappresenta il fattore di diluizione.

Metodo proposto:

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

Dosaggio dell'ocratossina A nel succo d'uva, nel succo d'uva ricostituito, nel succo d'uva concentrato e nel nettare d'uva, dopo il passaggio attraverso una colonna di immunoaffinità e cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelatore a fluorescenza

Metodo di Tipo IV

1. Campo di applicazione

Nell'ambito del presente documento si descrive il metodo utilizzato per il dosaggio dell'ocratossina A (OTA) nel succo d'uva, succo d'uva ricostituito, succo d'uva concentrato e nettare d'uva, in concentrazioni da 0,2 µg/L fino a 10 µg/L.

2. Principio

Questo metodo utilizza la colonna di immunoaffinità e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). L'OTA viene eluita con metanolo e quantificata mediante HPLC a fase inversa con rivelazione fluorimetrica.

3. Reagenti e prodotti

3.1. Reagenti per la separazione dell'OTA su una colonna di immunoaffinità. I reagenti elencati di seguito sono a titolo esemplificativo. I fornitori di colonne di immunoaffinità possono offrire soluzioni di diluizione ed eluenti adatti ai propri prodotti. In tal caso, è preferibile usare tali prodotti.

3.1.1. Sodio fosfato bibasico diidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) N. CAS [10028-24-7]

3.1.2. Diidrogenofosfato di sodio monoidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) N. CAS [10049-21-5]

3.1.3. Cloruro di sodio (NaCl) N. CAS [7647-14-5]

3.1.4. Acqua purificata per laboratorio, ad esempio di qualità EN ISO 3696.

3.1.5. Tampone fosfato (soluzione di diluizione).

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

3.1.6. Disciogliere 60,0 g di $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1) e 8,8 g di $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) in 950 mL d'acqua (3.1.4) e portare al volume di 1 L aggiungendo altra acqua.

3.1.7. Tampone fosfato salino (soluzione di lavaggio)

3.1.8. Disciogliere 2,85 g di $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1), 0,55 g di $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) e 8,70 g di NaCl (3.1.3) in 950 mL d'acqua (3.1.4) e portare al volume di 1 L aggiungendo altra acqua.

3.1.9. Metanolo (purezza ≥ 99,9%) (CH_3OH) N. CAS [67-56-1]

3.2. Reagenti per HPLC

3.2.1. Acetonitrile per HPLC (CH_3CN) N. CAS [75-05-8]

3.2.2. Acido acetico (purezza 100%) (CH_3COOH) N. CAS [64-19-7]

3.2.3. Fase mobile: acqua:acetonitrile:acido acetico, 99:99:2, v/v/v (proporzioni approssimative)

3.2.4. Miscelare 990 mL di acqua (3.1.4) con 990 mL di acetonitrile (3.2.1) e 20 mL di acido acetico (3.2.2). In caso di composti non solubilizzati, filtrare con un filtro da 0,45 □m. Degassare (ad esempio con elio) a meno che l'apparecchiatura per HPLC utilizzata già includa una fase di degassaggio.

3.3. Reagenti per la preparazione della soluzione madre di OTA

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

3.3.2. OTA (purezza ≥ 99,5%) N. CAS [303-47-9]

3.3.3. Miscela di solventi (toluene:acido acetico, 99:1, v/v)

Miscelare 99 parti in volume di toluene (3.3.1) con una parte in volume di acido acetico (3.2.2).

L'uso di una soluzione commerciale di concentrazione nota di circa 50 µg/mL, con un certificato di analisi che riporti il valore di riferimento e l'incertezza della concentrazione è preferibile rispetto all'uso di OTA in forma solida.

3.4. Soluzione madre di OTA

Disciogliere 1 mg di OTA o il contenuto di un pallone di raccolta (se l'OTA è stata

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

ottenuta sotto forma di film dopo l'evaporazione) nella miscela di solventi (3.3.3) per ottenere una soluzione contenente circa 20-30 µg/mL di OTA.

Per determinare la concentrazione esatta (se necessario), usare una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 1 cm, impostare lo spettro di assorbimento tra 300 e 370 nm e, come bianco, usare la miscela di solventi (3.3.3). Identificare l'assorbimento massimo e calcolare la concentrazione di OTA (C_{OTA}) in µg/mL utilizzando l'equazione seguente:

$$C_{OTA} = A_{MAX} \times M \times 100/\square \times \square$$

Dove:

A_{MAX} = assorbimento determinato dall'onda massima più lunga (circa 333 nm);

M = massa molare di OTA = 403,8 g/mol;

□ = coefficiente di estinzione molare di OTA nella miscela di solventi (3.3.3) (□ = 544 m^2/mol);

□ = cammino ottico (cm).

Questa soluzione rimane stabile per almeno 4 anni a -18 °C.

3.5. Soluzione standard di OTA a 2 □g/mL (toluene:acido acetico, 99:1, v/v)

Diluire la soluzione madre (3.4) con la miscela di solventi (3.3.3) per ottenere una soluzione standard di OTA a una concentrazione di 2 µg/mL.

È possibile conservare questa soluzione in frigorifero a una temperatura di +4 °C seppur sia necessario verificarne la stabilità all'uso.

4. Apparecchiatura

Materiale di laboratorio standard, in particolare:

4.1. Provette di vetro (da 4 mL)

4.2. Bilancia analitica

4.3. Matracci

4.4. Pipette

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

4.5. Micropipette

4.6. Sistema di estrazione in fase solida (SPE) per colonne di immunoaffinità

4.7. Serbatoio e tubo di flusso adattati alle colonne di immunoaffinità

4.8. Filtri in microfibra di vetro

4.9. Colonne di immunoaffinità specifiche per l'OTA

La capacità totale di legame della colonna deve essere pari ad almeno 100 ng di OTA. Ciò consentirà di ottenere una resa di purificazione di almeno l'85% quando la colonna viene attraversata da una soluzione diluita del campione contenente 100 ng di OTA.

4.10. Cromatografo liquido con una pompa per la fase mobile in grado di raggiungere una velocità di flusso costante di 1 mL/min isocratico. Il sistema di iniezione deve essere dotato di un circuito da 100 □L.

4.11. Colonna per HPLC analitica in acciaio, 150 x 4,6 mm (diametro interno) riempita con una fase stazionaria C18 (5 □m) preceduta da una pre-colonna o da un pre-filtro (0,5 □m) contenente una fase appropriata. Possono essere utilizzate colonne di diverse dimensioni a condizione che garantiscano una buona linea di base e rumore di fondo che consentono, tra l'altro, di rivelare i picchi di OTA.

4.12. Il rivelatore a fluorescenza viene collegato alla colonna con la lunghezza d'onda di eccitazione impostata a 333 nm e la lunghezza d'onda di emissione a 460 nm.

4.13. Sistema di acquisizione dati

4.14. Spettrofotometro UV

5. Preparazione dei campioni (a titolo esemplificativo)

5.1. Per il succo d'uva, il succo d'uva ricostituito, e il nettare d'uva

Versare 10 mL del campione in una beuta da 100 mL. Aggiungere 10 mL di soluzione di diluizione (3.1.5). Miscelare energicamente. Filtrare usando il filtro in microfibra di

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

vetro (4.8). È necessario procedere alla filtrazione nel caso di soluzioni torbide o in presenza di precipitati dopo la diluizione.

5.2. Per il succo d'uva concentrato

Per prima cosa, diluire il succo 5 volte (m/m) con acqua (3.1.4). Considerare questa diluzione nel calcolo finale della concentrazione di OTA (punto 8). Successivamente, versare 10 mL del campione diluito in una beuta da 100 mL. Aggiungere 10 mL di soluzione di diluizione (3.1.5). Miscelare energicamente. Filtrare usando il filtro in microfibra di vetro (4.8). È necessario procedere alla filtrazione nel caso di soluzioni torbide o in presenza di precipitati dopo la diluizione.

6. Procedimento

6.1. Purificazione mediante colonna di immunoaffinità (a titolo esemplificativo)

Diluire i campioni con un solvente adatto conformemente alle istruzioni riportate sul kit del fabbricante. Filtrare e purificare questa soluzione su una colonna di immunoaffinità. Impostare la colonna di immunoaffinità (4.9) al sistema SPE (4.6) e collegare il serbatoio (4.7).

Aggiungere 10 mL (equivalenti a 5 mL del campione) della soluzione diluita nel serbatoio. Far passare questa soluzione attraverso la colonna di immunoaffinità ad una velocità di 1 goccia al secondo. La colonna di immunoaffinità non deve seccarsi. Lavare la colonna di immunoaffinità con 5 mL di soluzione di lavaggio (3.1.6) e quindi con 5 mL di acqua (3.1.4) alla velocità di 1-2 gocce al secondo. Per far seccare la colonna, soffiare aria attraverso di essa. Eluire l'OTA in una provetta di vetro (4.1) con 2 mL di metanolo (3.1.7) alla velocità di 1 goccia al secondo. Portare a secco l'eluito a 50 °C con azoto. Ridisciogliere immediatamente in 250 µL della fase mobile dell'HPLC (3.2.3) e mantenere a 4 °C fino all'analisi HPLC.

6.2. Analisi HPLC

Utilizzando il circuito di iniezione, iniettare 100 µL di estratto ricostituito nel cromatografo.

Condizioni operative (a titolo esemplificativo)

Flusso: 1 mL/min

Fase mobile: acetonitrile:acqua:acido acetico, 99:99:2, v/v/v, (3.2.3)

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

- Rivelatore a fluorescenza: lunghezza d'onda di eccitazione = 333 nm
- Lunghezza d'onda di emissione = 460 nm

Volume di iniezione: 100 µL

7. Quantificazione dell'ocratossina A (OTA)

La concentrazione di OTA deve essere calcolata misurando l'area o l'altezza dei picchi al tempo di ritenzione dell'OTA e confrontando i valori con la curva di calibrazione.

7.1. Curva di calibrazione (a titolo esemplificativo)

Preparare una curva di calibrazione quotidianamente o ogniqualvolta vi siano variazioni nelle condizioni cromatografiche. Dosare 0,5 mL della soluzione standard di OTA (3.5) a 2 µg/mL in una provetta di vetro (4.1) ed evaporare il solvente utilizzando azoto. Ridisciogliere in 10 mL nella fase mobile dell'HPLC (3.2.3) precedentemente filtrata con un filtro con diametro dei pori da 0,45 µm. Ciò porta alla produzione di una soluzione di OTA a 100 µg/L. Preparare almeno 6 soluzioni di calibrazione per l'HPLC in 5 matracci tarati da 5 mL secondo quanto riportato in tabella 1 (a titolo esemplificativo).

Portare ogni soluzione standard a volume di 5 mL con la fase mobile dell'HPLC (3.2.3).

Iniettare 100 µL di ciascuna soluzione nell'HPLC.

Tabella 1. Curva di calibrazione

Standard di calibrazione	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6
µL di fase mobile HPLC filtrata (3.2.3)	4990	4975	4950	4900	4770	4500
µL di soluzione OTA a 100 µg/L	10	25	50	100	250	500
Concentrazione di OTA (µg/L)	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10
OTA iniettata (ng)	0,02	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00

NOTE:

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

1. Se la quantità di OTA nel campione non rientrasse nell'intervallo di calibrazione, si dovrebbe procedere a una diluizione appropriata. In questi casi, il calcolo della concentrazione finale al punto 8 dovrebbe essere riesaminato caso per caso.
2. Consultare la Guida concernente i punti critici del metodo di determinazione dell'ocratossina A tramite colonna di immunoaffinità (allegato III del metodo OIV-MA- AS315-10).

8. Calcoli

Calcolare la quantità di OTA nell'aliquota della soluzione testata e iniettata nella colonna HPLC.

Calcolare la concentrazione di OTA (C_{OTA}) in µg/L utilizzando la formula seguente:

$$C_{OTA} = MA \times F/V_1 \times V_3/V_2$$

Dove:

- MA è la massa di ocratossina A (in µg) nell'aliquota della matrice iniettata nella colonna e determinata in base alla curva di calibrazione;
- F è il fattore di diluizione;
- V_1 è il volume del campione da analizzare (0,01 L);
- V_2 è il volume della soluzione testata e iniettata nella colonna (100 µL);
- V_3 è il volume della soluzione utilizzata per disciogliere l'eluito secco (250 µL).

In caso di calibrazione diretta con soluzioni sintetiche, si deve prendere in considerazione il coefficiente di recupero delle colonne di immunoaffinità.

9. Espressione dei risultati

La quantità di OTA è espressa in microgrammi per litro (µg/L) con due cifre significative prendendo in considerazione l'incertezza.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

10. Caratteristiche del metodo

È stato condotto uno studio di validazione interna allo scopo di valutare l'idoneità del metodo per i succhi d'uva, prendendo in considerazione la linearità, i limiti di rivelabilità e quantificazione e l'accuratezza del metodo. L'ultimo parametro è stato determinato definendo i livelli di precisione ed esattezza del metodo.

10.1. Linearità del metodo

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi di regressione lineare, il metodo si è dimostrato lineare all'interno dei parametri mostrati in figura 1 e in tabella 2.

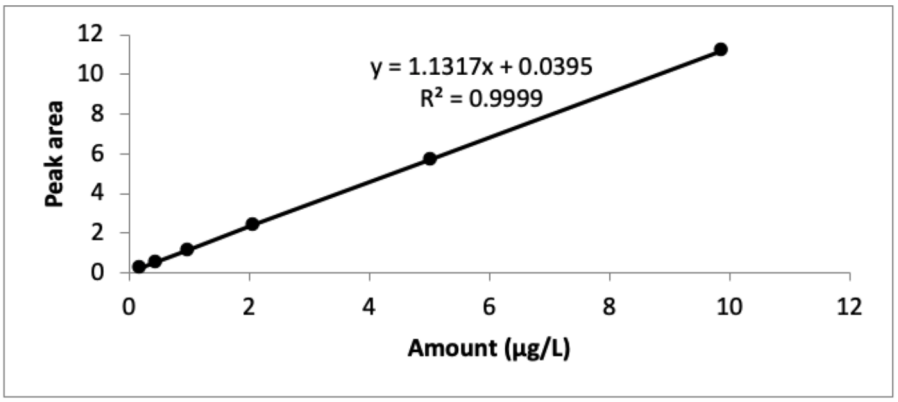


Figura 1. Curva di calibrazione dell'OTA

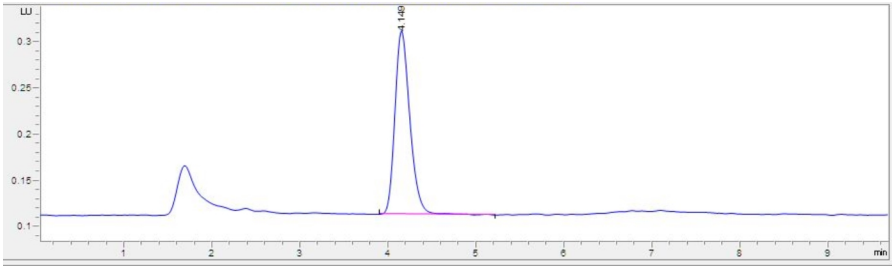


Figura 2. Cromatogramma di standard di OTA a 2,0 µg/L

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

10.2. Limite di rivelabilità e limite di quantificazione

Il limite di rivelabilità (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati a partire da una serie di otto ripetizioni analitiche di succo d'uva arricchito a 0,10 µg/L di OTA e sono uguali a 3 volte lo scarto tipo per il LOD e a 10 volte lo scarto tipo per il LOQ (tabella 2).

10.3. Precisione del metodo

I parametri presi in considerazione sono stati la ripetibilità e la riproducibilità, i cui valori sono riportati nella tabella 2. La ripetibilità è stata espressa come scarto tipo relativo delle misure ripetute a diverse concentrazioni ricavate per il succo di uva. La riproducibilità è stata espressa come la media dello scarto tipo relativo delle misurazioni dello stesso campione di succo d'uva, effettuate da diversi operatori.

10.4. Esattezza del metodo

La percentuale del recupero è stata determinata utilizzando un campione di succo d'uva arricchito con 6 concentrazioni diverse di OTA, in un intervallo compreso tra 0,10 µg/L fino a 10 µg/L. Ogni concentrazione è stata analizzata 5 volte. In figura 3 viene riportato un esempio di un cromatogramma del recupero.

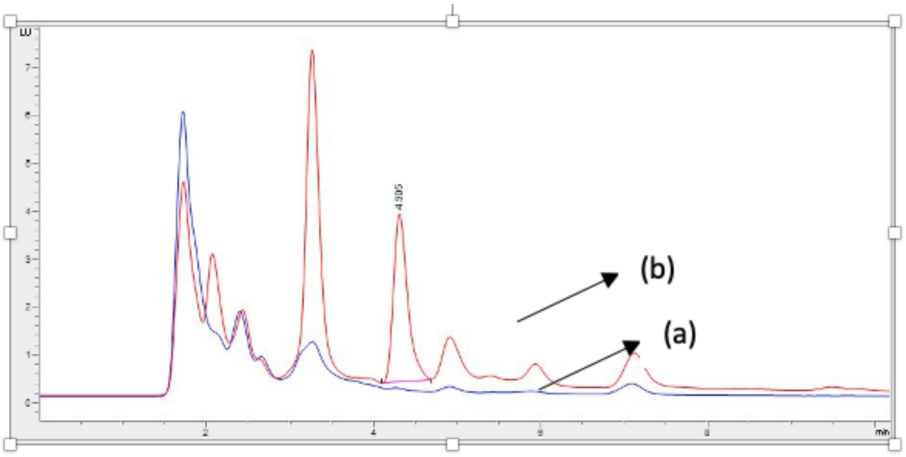


Figura 3. Un esempio di un cromatogramma del recupero di un succo d'uva (a) e di un succo d'uva arricchito a 2 µg/L di OTA (b).

Tabella 2. Caratteristiche del metodo

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

Intervallo di linearità (µg/L)	Coefficiente di determinazione (r^2)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Ripetibilità (n=7) RSD%	Riproducibilità (n=7) RSD%	Recupero (%)
0,20 - 10	0,9999	0,12	0,22	4,79	5,17	104,2 ± 2,9

11. Bibliografia

1. Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti dell'OIV. Metodo OIV-MA-AS315-10.

2. EN ISO 3696. Acqua per uso analitico di laboratorio — Metodi di prova e specifiche tecniche (ISO 3696:1995).

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022