

EFFICACIA DI UN KIT D'ANALISI RAPIDA PER LA DETERMINAZIONE DELL'OCRATOSSINA NEL VINO

Mergoni V.*, Bevis S.**, Gualla A.***, Pietri A.***

* Or Sell srl, Carpi (MO) ** R- Biopharm Rhone Ltd, Glasgow, Scotland, *** Istituto di Scienze degli alimenti e della nutrizione - Facoltà di Agraria - Università Cattolica del S. Cuore, Piacenza

Introduzione

L'ocratossina A (OTA), prodotta da diverse muffe del tipo *Aspergillus* e *Penicillium*, è una sostanza ben nota, cancerogena e nefrotossica per gli animali e l'uomo. L'ocratossina A può essere presente in diverse derrate alimentari come i cereali, l'uva passa, il caffè ed il vino. Nel gennaio 2005 la Commissione Europea ha fissato una soglia limite di 2,0 µg/l (ppb) per l'OTA del vino. È diventato quindi di fondamentale importanza avere a disposizione metodi qualitativi in grado di rilevare dei tenori di OTA superiori o prossimi ai limiti legali europei. L'obiettivo del presente studio è di valutare l'efficacia di un kit analitico rapido, utilizzandolo per la determinazione dell'ocratossina A in trenta campioni di vino rosso italiano naturalmente contaminati.

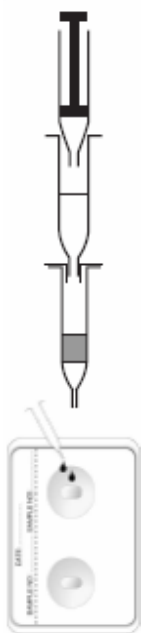
Procedura del test di analisi dell'ocratossina - Preparazione dei campioni

- Prendere 20 ml di vino rosso e portare il suo pH a 7,8 con idrossido di sodio 4N. Prelevare 6 ml di vino e diluirlo con 6 ml di tampone fosfato (PBS). Omogeneizzare con cura.
- Versare i 12 ml di campione diluito nella colonna d'immunoaffinità del kit d'analisi, alla velocità di una goccia al secondo oppure per gravità.
- Risciacquare la colonna diluendo 2 X 10 ml di 2PEG nel tampone PBS.
- Posizionare una provetta direttamente al di sotto della colonna e lasciare cadere lentamente per gravità 1 ml di metanolo attraverso la colonna per eluire l'ocratossina A dalla stessa.
- Durante il processo d'eluizione, si consiglia di invertire il flusso nella colonna o di rimettere il metanolo nella colonna due o tre volte, in modo da assicurare la completa eluizione dell'ocratossina A. Introdurre dell'aria attraverso la colonna tramite una siringa per recuperare le ultime gocce di eluato nella provetta.

- Prelevare con una pipetta 2 ml del tampone di diluizione fornito nel kit d'analisi rapida, Versare attraverso la colonna e recuperare nella stessa provetta. Miscelare capovolgendo la provetta.

Procedura di determinazione sul kit d'analisi rapida

- Verificare che le due aperture sulla carta presentino ciascuna due zone blu chiaro.
- Usando una micropipette, depositare 500µl di estratto del campione nell'apertura corrispondente sulla carta e attendere che il campione abbia completamente attraversato la membrana.
- Depositare con l'aiuto di una micropipetta 100µl di coniugato pronto all'uso nell'apertura ed attendere che il coniugato abbia attraversato completamente la membrana.
- Risciacquare con 100µl di tampone di lavaggio. Lasciare che il tampone penetri la membrana ed asciugare i bordi dell'orifizio con un tovagliolo di carta.
- Introdurre 100µl di substrato sulla membrana e lasciare che il colore si sviluppi per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Applicare 100µl di soluzione stop e rilevare il risultato immediatamente dopo il

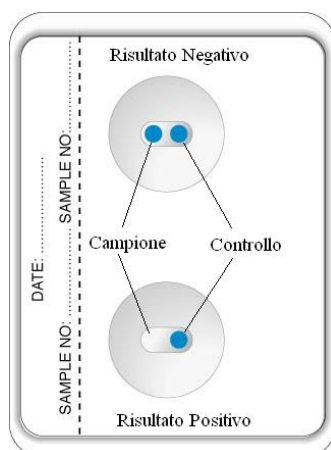


passaggio di quest'ultimo attraverso la membrana.

Interpretazione dei risultati del kit d'analisi rapida

La zona di controllo deve sviluppare un colore porpora nettamente visibile affinché il risultato del test sia valido.

Il colore della zona del campione e della zona controllo non sono necessariamente della stessa intensità.



Risultato negativo

Il campione si considera negativo (OTA contenuto nel vino inferiore a 2 ppb) quando sia la zona controllo che la zona campione presentano un colore porpora.

Risultato positivo

Il campione è positivo (più di 2 ppb) quando la zona campione non ha un evidente colore porpora.

Confronto tra risultati del kit e dati ottenuti per HPLC su vini rossi

Campione	RISULTATI KIT d'analisi rapida (ppb)	RISULTATI HPLC (ppb)	Campione	RISULTATI KIT d'analisi rapida (ppb)	RISULTATI HPLC (ppb)
1	Meno di 2	0,52	17	Più di 2	2,20
2	Più di 2	3,79	18	Più di 2	2,50
3	Meno di 2	0,71	19	Più di 2	2,59
4	Meno di 2	0,98	20	Più di 2	2,04
5	Meno di 2	0,09	21	Più di 2	6,20
6	Più di 2	4,18	22	Più di 2	8,80
7	Meno di 2	0,18	23	Meno di 2	1,98
8	Meno di 2	0,89	24	Più di 2	2,09
9	Più di 2	2,89	25	Meno di 2	1,65
10	Meno di 2	1,13	26	Meno di 2	0,04
11	Più di 2	3,80	27	Meno di 2	1,22
12	Più di 2	4,50	28	Meno di 2	1,35
13	Più di 2	2,96	29	Più di 2	2,02
14	Più di 2	1,26	30	Meno di 2	1,42
15	Meno di 2	0,20	31	Meno di 2	1,37 (valore certificato: 1,5 ± 0,15)
16	Più di 2	2,28	32	Più di 2	2,89 (valore certificato: 3,0 0,3)

Conclusioni

Ad eccezione di un campione di vino rosso (n. 14), i risultati ottenuti con il kit d'analisi rapida erano in accordo con quanto ottenuto per HPLC.

In seno allo studio di valutazione, due vini di riferimento (n. 31 e 32) sono stati analizzati anche, oltre che con il kit e per HPLC, anche utilizzando una colonna d'immunoaffinità per la preparazione dei campioni in combinazione con il metodo HPLC. I due metodi hanno confermato i valori dei certificati ufficiali.

Lo studio permette di concludere che il kit d'analisi rapida è un test appropriato per l'identificazione dell'ocratossina A nel vino in quantità prossime al limite legale di 2,0 µg/l (ppb).