



RISOLUZIONE OIV-OENO 578-2017

MONOGRAFIA SULLE FIBRE VEGETALI SELETTIVE

L'ASSEMBLEA GENERALE,

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

CONSIDERATI i lavori del Gruppo di esperti "Specificazione dei prodotti enologici",

CONSIDERATI i lavori del Gruppo di esperti "Tecnologia" relativi alla pratica enologica "Uso di fibre vegetali selettive nel vino",

DECIDE di integrare il *Codex enologico internazionale* con la seguente monografia:

FIBRE VEGETALI SELETTIVE

1. OGGETTO, ORIGINE E CAMPO DI APPLICAZIONE

Le fibre vegetali selettive derivano da parti commestibili di alcune piante, generalmente di origine cerealicola. Le fibre vegetali subiscono una successione di trattamenti meccanici e di estrazioni che permettono di concentrare il complesso attivo senza deteriorare la struttura della fibra vegetale. L'obiettivo è di aumentare la capacità di adsorbimento.

Le fibre vegetali attivate sono in grado di fissare l'ocratossina A e alcuni residui di pesticidi eventualmente presenti nel vino. Esse vengono utilizzate nella filtrazione dei vini.

2. ETICHETTATURA

L'etichetta deve contenere le seguenti informazioni:

- il nome o la denominazione commerciale,
- la dicitura "Prodotto a uso enologico",
- il numero di lotto e la data di scadenza,
- le condizioni di conservazione,
- l'origine e la composizione delle fibre,
- il nome o la ragione sociale del fabbricante,
- l'indirizzo del fabbricante,
- il contenuto netto.

3. CARATTERISTICHE

Il prodotto è insolubile e si presenta sotto forma di polvere molto fine.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

4. COMPOSIZIONE

Le fibre vegetali selettive possiedono un contenuto totale di composti parietali insolubili (frazione NDF) pari ad almeno il 90% (m/m), determinati mediante il metodo di Van Soest descritto nell'allegato 1.

5. TEST

5.1 Perdita in peso all'essiccamento

Porre 5 g di prodotto in un essiccatore a 90 °C per 15 minuti. La perdita in peso non deve superare l'8% del peso iniziale.

Tutti i limiti fissati di seguito si riferiscono al prodotto secco.

5.2 Ceneri

Incenerire progressivamente il residuo che si ottiene nel corso della determinazione della perdita in peso con l'essiccamento, senza superare i 550 °C.

Il peso delle ceneri deve essere inferiore all'1%.

5.3 Prodotti solubili in soluzione acquosa

Porre 10 g di fibre vegetali selettive in un recipiente da 250 mL. Quindi, agitando manualmente, versare lentamente 100 mL di acqua per ottenere una sospensione omogenea. Raccogliere le fibre vegetali selettive su un filtro e risciacquare il recipiente con acqua distillata per recuperare i residui delle fibre vegetali selettive. Dopo 48 h a una temperatura di 45 °C la perdita di composti solubili non deve superare il 3% del peso iniziale della sostanza secca.

5.4 Test di adsorbimento dei contaminanti

5.4.1 Pesticidi

La capacità di adsorbimento (K_F) di 2-cloro-N-(4'-clorobifenile-2-il) nicotinamide (Boscalid) da parte di una fibra vegetale selettiva, determinata secondo il metodo descritto nell'allegato 2, deve essere superiore o uguale a 1000 mg/kg per una dose di 2 g/L di fibre vegetali selettive.

5.4.2 Ocratossina A

La capacità di adsorbimento (K_F) di ocratossina A (OTA) da parte di una fibra vegetale selettiva, determinata secondo il metodo descritto nell'allegato 3, deve essere superiore o uguale a 1200 mg/kg per una dose di 2 g/L di fibre vegetali selettive.

5.5 Ferro

Quantificazione mediante spettrometria di assorbimento atomico secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Il tenore di ferro deve essere inferiore a 100 mg/kg.

5.6 Rame

Quantificazione mediante spettrometria di assorbimento atomico secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Il tenore di rame deve essere inferiore a 25 mg/kg.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

5.7 Piombo

Quantificazione mediante spettrometria di assorbimento atomico secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Il tenore di piombo deve essere inferiore a 5 mg/kg.

5.8 Mercurio

Quantificazione mediante spettrometria di assorbimento atomico secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Il tenore di mercurio deve essere inferiore a 1 mg/kg.

5.9 Arsenico

Quantificazione mediante spettrometria di assorbimento atomico secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Il tenore di arsenico deve essere inferiore a 1 mg/kg.

5.10 Cadmio

Quantificazione mediante spettrometria di assorbimento atomico secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Il tenore di cadmio deve essere inferiore a 1 mg/kg.

5.11 Salmonella

Verificare l'assenza di salmonella in 25 g di fibre vegetali selettive.

Eeguire la conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

5.12 Controllo batteriologico

Eeguire la conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Il contenuto totale di microrganismi vitali deve essere inferiore a $3 \cdot 10^4$ UFC/g.

5.13 Escherichia coli

Eeguire la conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*. È necessario verificarne l'assenza su un campione di 1 g.

5.14 Lieviti

Eeguire la conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Contenuto massimo: 10^3 UFC/g di preparazione.

5.15 Muffe

Eeguire la conta secondo il metodo descritto nel capitolo II del *Codex enologico internazionale*.

Contenuto massimo: 10^3 UFC/g di preparazione.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

ALLEGATO 1

1. Metodo d'analisi dei composti parietali insolubili (frazione NDF) secondo il metodo del crogiolo (Van Soest)

1.1 Principio

Analisi dei componenti della parete cellulare dei vegetali (emicellulosa, cellulosa e lignina) previa solubilizzazione delle proteine e dell'amido mediante trattamento con detergente neutro (ND).

1.2 Strumenti e materiali

1.2.1 Bilancia analitica (precisione di 0,001 g)

1.2.2 Stufa

1.2.3 Forno

1.2.4 Essiccatore

1.2.5 Crogioli filtranti (porosità di 40-100 μm)

1.2.6 Analizzatore di tipo Fibertec (o equivalente) semi-automatico o automatico chiuso, che consente di analizzare fino a 6 crogioli simultaneamente ed esegue l'aggiunta dei reagenti e le estrazioni, comprese le fasi di ebollizione, risciacquo e filtrazione.

1.3 Reagenti

1.3.1 α -amilasi, termostabile, ad esempio (rif.: A3306) Sigma Chemical Co.

1.3.2 Soluzione di detergente neutro (NDS); per 5 L di soluzione:

- laurilsolfato di sodio ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, p.m.: 288,4) – 150 g,
- acido etilendiamminotetracetico sale bisodico (EDTA sale bisodico) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p.m.: 372,23) – 93,05 g,
- tetraborato di sodio decaidrato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, p. m.: 381,37) – 34,05 g,
- disodio fosfato diidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p.m. : 177,99) – 22,8 g,
- trietilenglicole ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_4$, p.m. : 150,17) – 50 mL.

1.4 Procedimento

1.4.1 Fibre insolubili nel detergente neutro

- Preparazione dei crogioli

Per ogni campione di fibre vegetali preparare 2 crogioli:

(A) Crogiolo per isolare i componenti insolubili (NDF)
Pesare 2 g di fibre vegetali in un crogiolo asciutto e pulito.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Annotare il peso con una precisione di 0,001 g (W = peso del campione).

(B) Crogiolo per misurare il contenuto di ceneri nel campione

Pesare 1 g di fibre vegetali in un crogiolo asciutto e pulito.

Annotare il peso con una precisione di 0,001 g (P = peso del campione).

- Inserimento dei crogioli nel sistema di tipo Fibertec

A ciascun campione, aggiungere 100 mL di soluzione NDS (1.3.2) a temperatura ambiente.

Aggiungere 50 μ L di α -amilasi (1.3.1).

Portare ad ebollizione e mantenere l'ebollizione come segue:

riscaldare per 5-10 minuti fino al raggiungimento dell'ebollizione; abbassare la temperatura e aggiungere dell'antischiama (ad es. acido ottanoico) all'inizio dell'ebollizione; regolare la temperatura per mantenere l'ebollizione e continuare a riscaldare per 60 minuti.

Dopo 1 ora di estrazione, interrompere il riscaldamento e rimuovere la soluzione NDS con un sistema di aspirazione.

- Risciacquo e filtrazione

In ciascun crogiolo, aggiungere 40 mL di acqua calda (90-100 °C), agitare/mescolare i campioni e lasciar infondere per 2 minuti.

Filtrare sotto vuoto.

Ripetere l'operazione 4 volte.

In ciascun crogiolo, aggiungere dell'acetone e lasciar infondere per 2 minuti. Filtrare sotto vuoto.

Ripetere l'operazione 2 volte.

- Rimozione dei crogioli

Risciacquare il crogiolo (A) due volte con acqua calda (90-100 °C) e lasciarlo a 105 °C per 12 ore.

lasciare il crogiolo (B) a 105 °C per 12 ore, raffreddarlo in un essiccatore e pesarlo. Sia $W1$ il peso:

$W1$ = crogiolo + frazione NDF + ceneri totali (TA).

lasciarlo in seguito a 500 °C per 3 ore, raffreddarlo in un essiccatore e pesarlo. Sia $W4$ il peso:

$W4$ = crogiolo + ceneri totali (TA).

1.4.2 Determinazione del tenore di estratto secco (ES)

Pesare un vetrino da orologio con una precisione di 0,001 g (W_{DM}).

Pesare con una precisione di 0,001 g, 2 g di fibre vegetali in un vetrino da orologio asciutto e pulito. Sia $W2$ = peso prima dell'essiccazione.

Porre il vetrino a 105 °C per 16 ore, lasciarlo raffreddare nell'essiccatore e pesare.

Sia $W3$ = peso dopo l'essiccazione.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

1.5. Calcoli

1.5.1 Determinazione dell'estratto secco

$$\text{ES (\%)} = \frac{W3 - W_{DM}}{W2} \times 100$$

1.5.2 Determinazione della frazione insolubile di fibre vegetali nel detergente neutro "neutral detergent fiber" (NDF)

$$\text{NDF (\%)} = \frac{(W1 - W4)}{\% \text{ ES}} \times 100$$
$$W \times \frac{\quad}{100}$$

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

ALLEGATO 2

2. Misurazione della capacità di adsorbimento di pesticidi da parte delle fibre vegetali selettive

2.1 Principio

Determinazione della capacità di adsorbimento da parte delle fibre vegetali selettive di un fungicida utilizzato per il trattamento della vite il cui nome commerciale è Boscalid.

Nome chimico (IUPAC): 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide

Formula chimica: C₁₈H₁₂Cl₂N₂O

N. CAS: 188425-85-6

Il metodo proposto si riferisce alla determinazione dell'isoterma di Freundlich.

2.2 Norme di sicurezza

I pesticidi sono potenzialmente tossici e devono pertanto essere manipolati in condizioni di sicurezza che proteggano gli analisti, in particolar modo durante la preparazione delle soluzioni madre a partire da standard analitici puri. Gli operatori devono proteggere le mani e gli occhi e manipolare i prodotti sotto cappa aspirante.

2.3 Strumenti e materiali

2.3.1 Vetreria da laboratorio tradizionale: matracci graduati, pipette e provette

2.3.2 Bilancia analitica (precisione di 0,001 g)

2.3.3 Agitatore magnetico

2.3.4 Centrifuga

2.4 Reagenti

2.4.1 Standard analitico di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide in polvere, purezza > 99%

2.4.2 Acetone di qualità analitica per l'analisi dei residui

2.4.3 Preparazione di soluzioni standard di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide:

2.4.3.1 - Soluzione madre di 1000 mg/L di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide in acetone: sciogliere esattamente 50 mg di polvere pura di standard analitico in 50 mL di acetone. La soluzione madre può essere conservata a -20 °C al massimo per un anno.

2.4.3.2 - Soluzioni figlie a 100, 10 e 1 mg/L di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide in acetone ottenute da diluizioni successive della soluzione madre in acetone. Le soluzioni figlie possono essere conservate a -20 °C al massimo per 6 mesi.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

2.5 Procedimento

Nella tabella 1 riportata di seguito è presentata una sintesi delle condizioni utilizzate per la preparazione dei vini di controllo e dei vini per l'analisi.

2.5.1 Preparazione dei vini testimoni

I campioni testimoni si preparano utilizzando un vino che non contiene pesticidi nel quale si aggiungono nove concentrazioni crescenti di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide con l'obiettivo di ottenere, ad esempio, 500 mL di ciascun vino arricchito (cfr. tabella 1). Le aggiunte si effettuano con le soluzioni standard figlie (2.4.3.2). Si eseguono due repliche per concentrazione. Si procede quindi ad analizzare i nove vini di controllo per misurare le concentrazioni iniziali di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide.

2.5.2 Preparazione dei vini per la prova

I nove vini aggiunti di pesticidi (2.5.1) si pongono a contatto con le fibre vegetali selettive.

Procedimento:

Aggiungere 0,4 g di fibre vegetali selettive a un piccolo volume di vino testimone aggiunto di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide, quindi versare la miscela in un matraccio graduato da 200 mL e portare al volume di 200 mL con lo stesso vino (la quantità di fibra vegetale è pari a 2 g/L).

Lasciare il vino a contatto con le fibre vegetali in una provetta chiusa per 45 minuti su un agitatore magnetico. Centrifugare per 5 minuti a 4500 rpm (3600 g). Separare il surnatante dal precipitato e procedere alla quantificazione dei residui del 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide al fine di ottenere le concentrazioni residue misurate nel surnatante.

Ripetere questa operazione per i nove vini testimoni aggiunti di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide (2.5.1). Eseguire due repliche per concentrazione.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Tabella 1: sintesi delle condizioni per la determinazione della capacità di adsorbimento di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide

Tempo di contatto	45 minuti
Vino utilizzato per la prova	Vino non contenente pesticidi (analisi preliminare)
Fibre vegetali selettive	Quantità pari a 2 g/L (vini per la prova) Assenza (vini testimoni)
Molecola del pesticida testato	2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide (nome comune: boscalid)
Concentrazioni aggiunte di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide	5 µg/L 15 µg/L 30 µg/L 60 µg/L 120 µg/L 240 µg/L 480 µg/L 960 µg/L 1500 µg/L
Numero di ripetizioni	2
Centrifugazione (parametri)	Temperatura ambiente 4500 rpm (circa 3600 g) per 5 minuti
Metodo d'analisi del residuo di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide	Quantificazione dei residui di pesticidi nel vino dopo estrazione secondo il metodo QuEChERS (OIV-MA-AS323-08, metodo di tipo II) e analisi successiva degli estratti mediante UPLC/MS/MS

2.6. Calcoli

La determinazione della capacità di adsorbimento del 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide è calcolata utilizzando la seguente equazione di Freundlich:

$$C_{Ads} = K_F * C_{Res}^{1/n}$$

Oppure la sua forma lineare: $\text{Log } C_{Ads} = 1/n \text{ Log } C_{Res} + \text{Log } K_F$

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

dove:

“ K_F ” = capacità di adsorbimento della molecola da parte della fibra vegetale selettiva espressa in $\mu\text{g/g}$ di fibra

“ n ” = affinità della fibra vegetale selettiva per la molecola

e dove:

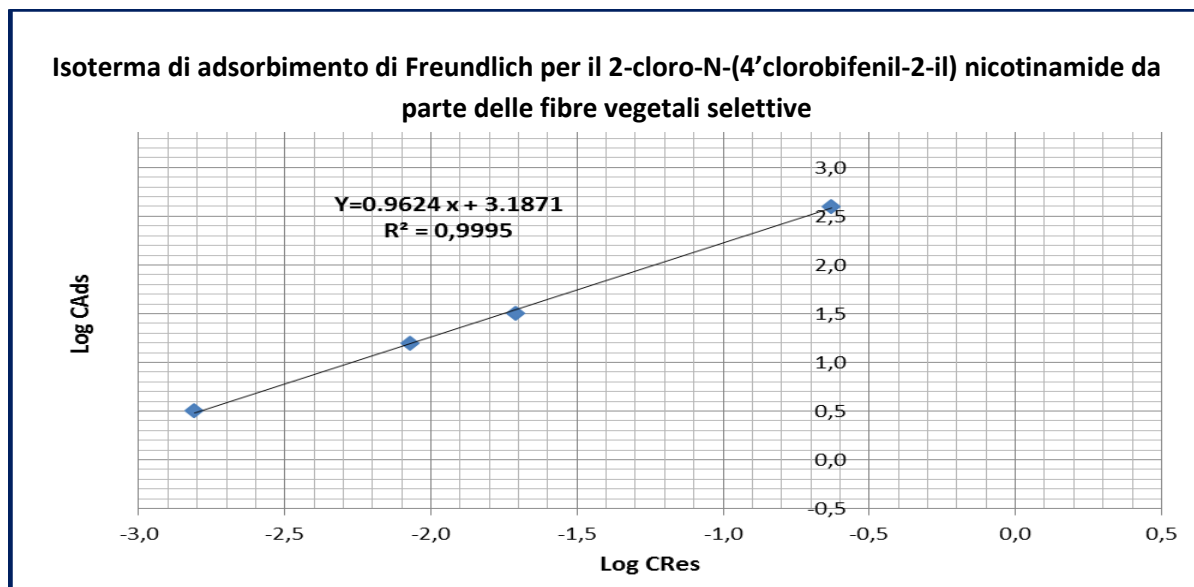
- **CRes = concentrazione residua in $\mu\text{g/mL}$** di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide, misurata nel vino dopo il contatto con le fibre vegetali selettive
- **CAds = concentrazione adsorbita in $\mu\text{g/g}$** di fibra vegetale selettiva
 - o CAds in $\mu\text{g/g}$ = CAds in $\mu\text{g/L}$ / 2 (posto che la concentrazione di adsorbente sia pari a 2 g di fibra/L di vino)
 - o **CAds in $\mu\text{g/L}$ = concentrazione iniziale in $\mu\text{g/L}$** misurata nel vino testimone arricchito prima del contatto con le fibre vegetali selettive – **CRes in $\mu\text{g/L}$**

Partendo dalle concentrazioni residue misurate ($\mu\text{g/L}$), per ciascuna concentrazione iniziale si calcolano le concentrazioni adsorbite ($\mu\text{g/L}$) di 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide.

Si traccia la retta di regressione **Log CAds = 1/n Log CRes + Log K_F** .

La regressione di adsorbimento di Freundlich del pesticida da parte della fibra vegetale selettiva consente di calcolare le due costanti di Freundlich: la capacità di adsorbimento in $\mu\text{g/g}$ (K_F) e l'affinità della fibra per il pesticida (n). Attraverso l'equazione della retta $y = ax + b$ è possibile ottenere il coefficiente angolare $a = 1/n$ e il valore $b = \text{Log } K_F$.

Esempio: isoterma di Freundlich per il 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide



*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Pertanto, secondo l'esempio di cui sopra, si può calcolare:

$b = \text{Log KF} = 3,1871$ sia $\text{KF} = 10^b = 1538,54$

$a = 1/n = 0,9624$ sia $n = 1/a = 1,04$

L'affinità (n) della fibra vegetale selettiva per il 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide è pari a 1,04 e la capacità di adsorbimento (KF) del 2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamide da parte della fibra vegetale selettiva è di 1538,54 µg/g o mg/kg di fibra.

ALLEGATO 3

3. Misurazione della capacità di adsorbimento di ocratossina A da parte delle fibre vegetali selettive

3.1 Principio

Determinare la capacità di adsorbimento da parte delle fibre vegetali selettive di una micotossina:

Nome commerciale: Ocratossina A (OTA)

Nome chimico (IUPAC): ([[3R]-5-cloro-8-idrossi-3-metil-1-oxo-7-isocromanil]carbonil)-3-fenil-L-alanina

Formula chimica: C₂₀H₁₈ClNO₆

N. CAS: 303-47-9

Il metodo proposto si riferisce alla determinazione dell'isoterma di Freundlich.

3.2 Norme di sicurezza

L'ocratossina A è una tossina classificata dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) nel gruppo 2B come possibile cancerogeno per l'uomo. Questa deve quindi essere manipolata in condizioni di sicurezza che proteggano gli analisti, in particolar modo durante la preparazione delle soluzioni madre a partire da standard analitici puri. Gli operatori devono proteggere le mani e gli occhi e manipolare il prodotto sotto cappa aspirante.

3.3 Strumenti e materiali

3.3.1 Vetreria da laboratorio tradizionale: matracci graduati, pipette e provette

3.3.2 Bilancia analitica (precisione di 0,001 g)

3.3.3 Agitatore magnetico

3.3.4 Centrifuga

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

3.4 Reagenti

3.4.1 Standard analitico di ocratossina A (OTA) in polvere, purezza > 99%

3.4.2 Toluene, metanolo ed etanolo puri (di qualità HPLC)

3.4.3 Tampone acetato di sodio, pH 5,2, 0,1 mol/L: disciogliere 13,061 g di acetato di sodio triidrato in 900 mL di acqua distillata. Aggiustare il pH a 5,2 con acido acetico, quindi portare al volume di 1000 mL con acqua distillata

3.4.4 Preparazione delle soluzioni standard di ocratossina A:

3.4.4.1 - Soluzione madre a 50 mg/L nella miscela toluene-acido acetico: disciogliere esattamente 5 mg di ocratossina pura (3.4.1) in 100 mL di miscela toluene-acido acetico (99:1, v/v). La soluzione madre può essere conservata a -20 °C al massimo per un anno.

3.4.4.2 - Soluzione di lavoro a 20 mg/L in metanolo: far evaporare, utilizzando un flusso di azoto, un'aliquota (20 mL) di soluzione madre, quindi sciogliere nuovamente in 50 mL di metanolo puro. La soluzione di lavoro può essere conservata a -20 °C al massimo per 6 mesi.

3.4.4.3 - Soluzioni contenenti le aggiunte di 10, 5 e 2 mg/L in etanolo: eseguire delle diluizioni successive della soluzione di lavoro in etanolo assoluto. Le soluzioni contenenti le aggiunte possono essere conservate a -20 °C per massimo 2 mesi.

3.5 Procedimento

Nella tabella 2 riportata di seguito è presentata una sintesi delle condizioni utilizzate per la preparazione delle soluzioni testimone e delle soluzioni di prova.

3.5.1 Preparazione delle soluzioni testimone

Le soluzioni testimone si preparano partendo da una soluzione tampone di acetato di sodio a pH 5,2 (3.4.3) nella quale si aggiungono nove concentrazioni crescenti di ocratossina A al fine di ottenere, ad esempio, 50 mL di ogni soluzione testimone arricchita (cfr. tabella 2). Per le aggiunte si utilizzano le soluzioni 3.4.4.3. Si eseguono due repliche per concentrazione. Si procede quindi ad analizzare l'ocratossina A nelle nove soluzioni testimoni al fine di ottenere le concentrazioni iniziali misurate.

3.5.2 Preparazione delle soluzioni di prova

Le nove soluzioni arricchite con OTA (3.5.1) si pongono a contatto con la fibra vegetale selettiva.

Procedimento:

Aggiungere 0,05 g di fibre vegetali selettive a un piccolo volume di soluzione tampone di acetato di sodio a pH 5,2 arricchito con OTA, quindi versare la miscela in un matraccio graduato da 25 mL e portare al volume di 25 mL con la stessa soluzione tampone (la quantità di fibra vegetale è pari a 2 g/L). Dopo 45 minuti di contatto con le fibre vegetali selettive sotto agitazione, centrifugare le sospensioni e separare il surnatante dal precipitato delle fibre. Ripetere questa operazione per le nove soluzioni testimone aggiunte

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

di ocratossina A (3.5.1). Quantificare quindi l'ocratossina A mediante HPLC al fine di ottenere le concentrazioni residue misurate nel surnatante. Eseguire due repliche per concentrazione.

Tabella 2: sintesi delle condizioni per la determinazione della capacità di adsorbimento di OTA

Tempo di contatto	45 minuti
Tampone utilizzato per l'analisi	Acetato di sodio (pH 5,2)
Fibre vegetali selettive	Quantità pari a 2 g/L (soluzione per l'analisi) Assenza (soluzioni di controllo)
Concentrazioni delle aggiunte di ocratossina A	2 µg/L 5 µg/L 20 µg/L 125 µg/L 450 µg/L 900 µg/L 2000 µg/L 5000 µg/L 10.000 µg/L
Numero di ripetizioni	2
Centrifugazione (parametri)	Temperatura ambiente 10.000 rpm (circa 13.000 g) per 2-3 minuti
Metodo d'analisi dell'ocratossina A	Quantificazione dell'ocratossina A nei vini mediante colonna di immunoaffinità (OIV-MA-AS315-10) e successiva analisi mediante HPLC con rivelatore fluorimetrico

3.6. Calcoli

La determinazione della capacità di adsorbimento dell'ocratossina A è calcolata utilizzando la seguente equazione di Freundlich:

$$CA_{Ads} = K_F * C_{Res}^{1/n}$$

Oppure la sua forma lineare: $\text{Log } CA_{Ads} = 1/n \text{ Log } C_{Res} + \text{Log } K_F$

dove

“KF” = capacità di adsorbimento della molecola da parte della fibra vegetale selettiva espressa in µg/g di fibra

“n” = affinità della fibra vegetale selettiva per la molecola

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

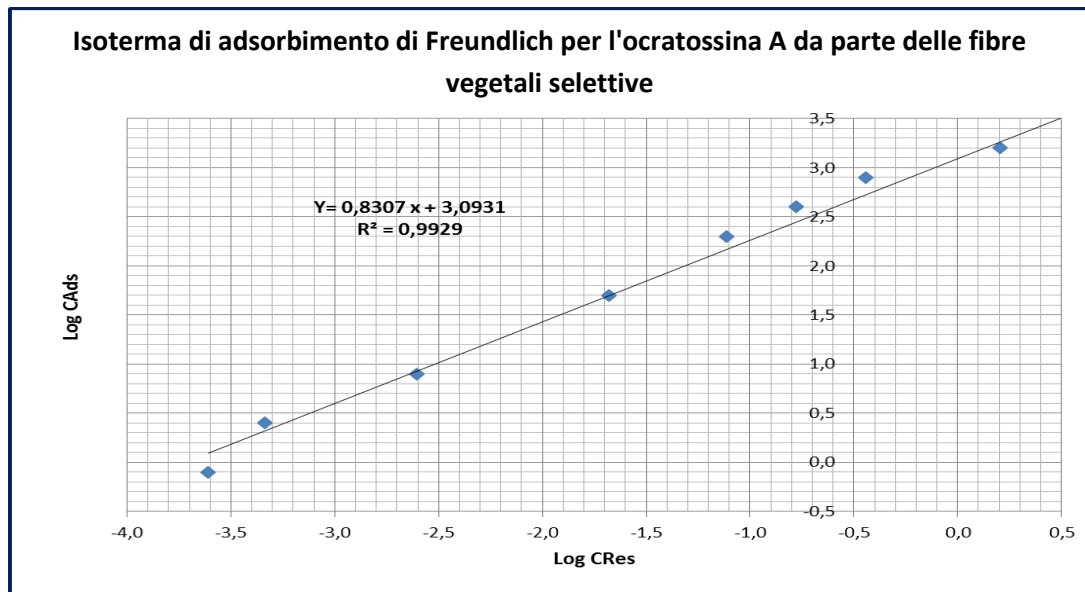
Jean-Marie AURAND

e dove:

- **CRes = concentrazione residua in $\mu\text{g/mL}$** di ocratossina A, misurata nella soluzione di prova dopo il contatto con le fibre vegetali selettive
- **CAds = concentrazione adsorbita in $\mu\text{g/g}$** di fibre vegetali selettive
 - o $\text{CAds in } \mu\text{g/g} = \text{CAds in } \mu\text{g/L} / 2$ (posto che la concentrazione di adsorbente sia pari a 2 g di fibra/L di soluzione tampone)
 - o **CAds in $\mu\text{g/L} = \text{concentrazione iniziale in } \mu\text{g/L}$** misurata nella soluzione testimone prima del contatto con le fibre vegetali selettive – **CRes in $\mu\text{g/L}$**

Partendo dalle concentrazioni residue misurate ($\mu\text{g/L}$), si calcolano le concentrazioni adsorbite ($\mu\text{g/L}$) di ocratossina A per ciascuna concentrazione iniziale e si traccia la retta di regressione **Log CAds = 1/n Log CRes + Log Kf**. La regressione di adsorbimento di Freundlich dell'ocratossina A da parte della fibra vegetale selettiva consente di calcolare le due costanti di Freundlich: la capacità di adsorbimento in $\mu\text{g/g}$ (K_f) e l'affinità della fibra per l'ocratossina A (n). Attraverso l'equazione della retta $y = ax + b$ è possibile ottenere il coefficiente angolare $a = 1/n$ e il valore $b = \text{Log } K_f$.

Esempio: isoterma di Freundlich per l'ocratossina A



Pertanto, secondo l'esempio di cui sopra, si può calcolare:

$b = \text{Log } K_f = 3,0931$ sia $K_f = 10^b = 1239,21$

$a = 1/n = 0,8307$ sia $n = 1/a = 1,2$

L'affinità (n) della fibra vegetale selettiva per l'ocratossina A è pari a 1,2 e la capacità di adsorbimento (K_f) dell'ocratossina A da parte della fibra vegetale selettiva è pari a 1239,21 $\mu\text{g/g}$ o mg/kg di fibra.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND