

# AO ZON PREP<sup>®</sup>

Cod. Prodotto: P112 / P112B

Colonne ad immunoaffinità da utilizzare in associazione all'HPLC o LC-MS/MS.  
Solo per uso in vitro.

P112/V11/17.09.21

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**



<b>Contenuto</b>	<b>Pag</b>
Principio del Test .....	4
Reagenti Non Forniti .....	4
Prodotti Accessori .....	4
Rischi .....	4
Metodi raccomandati e note applicative .....	4
Decontaminazione .....	5
Conservazione e Durata .....	5
Campionamento .....	5
Sensibilità .....	5
Recupero .....	5
Preparazione della Colonna .....	6
Eluizione .....	6
<b>Informazioni sulla HPLC</b> .....	<b>7</b>
• Preparazione del campione - Cereali e alimenti per neonati .....	7
• Preparazione dei campioni: segale .....	8
• Preparazione degli standard .....	9
• Preparazione di 1.000 ng/ml di soluzione stock di aflatossine totali .....	9
• Preparazione di 1.000 ng/ml di soluzione stock di ocratossina A .....	9
• Preparazione di 1.000 ng/ml di soluzione stock di zearalenone .....	9
• Curva di calibrazione .....	10
• Diluizione dello standard di aflatossine totali .....	10
• Diluizione dello standard di ocratossina A .....	10
• Diluizione dello standard di zearalenone .....	10
• Standard di lavoro combinato .....	10
• Condizioni raccomandate per l'HPLC .....	11
• Aflatossine totali e ocratossina A .....	11
• Zearalenone .....	11
• Informazioni sulla HPLC, cromatogrammi tipici .....	12
• Esempio di cromatogramma HPLC per mais .....	12
• Esempio di cromatogramma HPLC per segale .....	13
<b>Informazioni sulla LC-MS/MS</b> .....	<b>14</b>
• Preparazione dei campioni: cereali .....	14
• Preparazione dei campioni: segale .....	15
• Preparazione dei campioni: alimenti per neonati .....	16
• Preparazione degli standard .....	17
• Soluzione stock di aflatossine .....	17
• Soluzione stock di ocratossina A .....	17
• Soluzioni stock di zearalenone .....	17
• Curva di calibrazione .....	18
• Raccomandazioni per la LC-MS/MS .....	19
• Informazioni sulla LC-MS/MS: cromatogrammi tipici .....	20
• Esempio di cromatogramma LC-MS/MS per alimenti per neonati .....	20
• Informazioni sulla LC-MS/MS: cromatogrammi tipici .....	21
• Esempio di cromatogramma LC-MS/MS per la segale .....	21
Qualità .....	22
Supporto Tecnico .....	22
Riconoscimenti .....	22
Garanzia .....	22

## Principio del Test

La procedura si basa sulla tecnologia dell'anticorpo monoclonale, che rende il test altamente specifico, sensibile, rapido e semplice da eseguire.

Le colonne contengono una sospensione in gel di anticorpi monoclonali specifici per la tossina di interesse. Dopo l'estrazione della tossina, il campione estratto viene filtrato, diluito e fatto passare lentamente attraverso la colonna ad immunoaffinità. L'eventuale tossina presente nel campione è trattenuta dall'anticorpo all'interno della sospensione in gel. La colonna viene lavata per rimuovere il materiale non legato e successivamente le tossine sono rilasciate dalla colonna mediante una eluizione con solvente. L'eluato viene raccolto prima dell'analisi mediante HPLC o LC-MS/MS. Di aflatoxina, se analizzate mediante HPLC, devono prima essere derivatizzate.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 20 minuti. Lo scopo è quello di migliorare la purificazione e la concentrazione della tossina da alimenti e mangimi per ottenere un cromatogramma più preciso e quindi una determinazione più accurata e sensibile. Le colonne hanno l'ulteriore vantaggio di poter essere utilizzate per l'analisi di una vasta gamma di campioni

## Reagenti non Forniti

- Acqua distillata / deionizzata (adatta per HPLC, es. MilliQ)
- Solventi (metanolo per HPLC e Acetonitrile)
- Pastiglie PBS (RP202)\*
- Standard di micotossine (si prega di far riferimento alla sezione relativa alla preparazione degli standard)
- Cloruro di sodio
- Idrossido di sodio (a pH filtrato se necessario)
- Acido nitrico (richiesto solo per la derivatizzazione con la KOBRA® CELL)
- Bromuro di potassio (richiesto solo per la derivatizzazione con la KOBRA® CELL)

## Prodotti Accessori

- Carta da filtro Whatman No. 113 oppure No. 4
- KOBRA® CELL (K01)\*
- Supporto per colonne ad immunoaffinità (CR1)\*
- Pacchetto di accessori per colonne ad immunoaffinità (AP01)\*

\* Disponibili presso R-Biopharm. Per ulteriori informazioni, si prega di contattare il distributore locale R-Biopharm.

## Rischi

Le micotossine sono sostanze molto pericolose. Solo laboratori attrezzati possono eseguire questo tipo di analisi, durante le quali è necessario indossare indumenti protettivi come camici, guanti e occhiali protettivi.

Conservare i solventi infiammabili in un armadietto antiesplorazione. Se possibile, operare sotto cappa chimica ed utilizzare attrezzature protettive.

Per ulteriori informazioni, è possibile contattare il distributore locale R-Biopharm e richiedere la scheda di sicurezza

## **Metodi raccomandati e note applicative**

I metodi sono disponibili per tutte le matrici a norma di legge, oltre che per altri prodotti. Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm.

## **Decontaminazione**

Le soluzioni standard in eccesso devono essere trattate, prima dello smaltimento, con almeno un decimo del loro volume di ipoclorito di sodio al 5 %. Immergere la strumentazione e il materiale residuo contaminato in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5 % per 30 minuti, poi aggiungere il 5 % di acetone e lasciare in ammollo per altri 30 minuti. Sciacquare abbondantemente con acqua prima dello smaltimento. Dopo la decontaminazione lavare scrupolosamente tutta l'attrezzatura di laboratorio utilizzata. Incenerire ove consentito dai regolamenti.

## **Conservazione e Durata**

Le colonne hanno una durata di 18 mesi dalla data di produzione se conservate a 2 - 8 °C oppure di 12 mesi dalla data di produzione se conservate a 21 - 25 °C. Non congelare.

Assicurarsi che le colonne non si siano asciugate e che contengano il tampone sopra al gel. Si tenga presente che gli anticorpi contenuti nelle colonne possono essere denaturati da forti variazioni di temperatura o pH.

## **Campionamento**

E' necessario ottenere un campione sufficientemente rappresentativo seguendo una delle procedure di campionamento ufficialmente riconosciute. Si raccomanda di tritare finemente almeno 1 kg di campione rappresentativo e di prelevare ed estrarre una parte di esso (10 - 50 g in base al metodo utilizzato).

## **Sensibilità**

La sensibilità dipende dal sistema di rilevazione finale utilizzato dall'analista. Tuttavia, se richiesto, la sensibilità del test può essere migliorata aumentando il volume del campione che viene fatto passare attraverso la colonna ad immunoaffinità.

## **Recupero**

Se un analista desidera tenere in considerazione le perdite che possono avvenire durante l'estrazione, si raccomanda di analizzare un campione arricchito dello stesso tipo di matrice testata seguendo la procedura completa come per uno standard di riferimento. I valori di recupero ottenuti con il campione arricchito possono essere successivamente utilizzati per correggere i risultati ottenuti dall'analisi del campione.

## Preparazione della Colonna

Le colonne ad immunoaffinità devono trovarsi a temperatura ambiente prima dell'uso.

E' normale che ci sia dello spazio tra il gel ed il setto poroso. Talvolta, durante il trasporto, si può formare una bolla in questo spazio. In questi casi, per rimuovere la bolla, basta semplicemente picchiettare la base della colonna su una superficie rigida.

Rimuovere il cappuccio dalla parte superiore della colonna ed eliminarlo. Fissare saldamente la colonna ad un serbatoio in vetro da siringa mediante adattatore, quindi inserirla nel supporto per colonne o nel supporto a morsetto.

## Eluizione

Al fine di eluire completamente la tossina o le tossine dalla colonna di immunoaffinità è fondamentale che il solvente rimanga a contatto con l'anticorpo contenuto nella sospensione in gel per un periodo di tempo sufficiente. Questo assicura che tutti i legami tra l'anticorpo e la tossina siano spezzati, e infine il rilascio di tutta la tossina dalla colonna per l'analisi con il sistema di rivelazione prescelto

Per garantire che il solvente rimanga a contatto con gli anticorpi in sospensione nel gel per un periodo di tempo sufficiente, è possibile utilizzare uno qualsiasi dei seguenti metodi di eluizione: -

Backflush (metodo preferito da R-Biopharm): backflush sollevando e abbassando delicatamente lo stantuffo della siringa durante il passaggio del solvente attraverso la colonna. Questo processo inverte la direzione del flusso dell'eluato attraverso il gel. La procedura dovrebbe essere ripetuta 3 volte prima di raccogliere l'eluato. Procedere alla fase successiva del metodo.

Applicazione di piccoli volumi di solvente: applicare il volume di solvente necessario per l'eluizione in due o tre aliquote più piccole. Attendere che ogni aliquota rimanga a contatto con la sospensione in gel per almeno 30 secondi prima di lasciarla completamente passare attraverso la sospensione per la raccolta. Procedere alla fase successiva del metodo.

Incubazione con solvente: applicare l'intero volume di solvente necessario per l'eluizione e lasciar passare 2-3 gocce di solvente attraverso la colonna per la raccolta. Attendere che la parte restante del solvente resti a contatto con la sospensione in gel per almeno 60 secondi prima di lasciarla completamente passare attraverso la sospensione per la raccolta. Procedere alla fase successiva del metodo.



## Preparazione del Campione

### • Cereali e alimenti per bambini

Questo metodo è stato testato su una serie di materie prime, tra cui grano e mais, e su alimenti per l'infanzia.

1. Pesare 25 g di campione tritato e 5 g di cloruro di sodio in un contenitore per miscelatore resistente ai solventi dalla capacità di 1 litro.
2. Aggiungere 100 ml di metanolo all' 80 % e mescolare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione utilizzando carta da filtro Whatman N. 113 oppure N. 4. In alternativa centrifugare a 4,000 rpm per 10 minuti.
4. Diluire 10 ml del filtrato con 40 ml di PBS.
5. Far passare 20 ml del filtrato (equivalente a 1 g di campione) attraverso la colonna con un flusso di 2 ml al minuto (in alternativa è possibile far passare la soluzione attraverso la colonna per gravità). Per la "cattura" della tossina da parte dell'anticorpo è essenziale applicare una pressione lenta e costante.
6. Lavare la colonna facendo passare 20 ml di PBS con un flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
7. Eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1.5 ml di metanolo al 100 % e raccoglierlo in una provetta di vetro da 5 ml. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
8. A seguito della eluizione, far passare 1.5 ml di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa provetta per avere un volume finale di 3 ml.
9. Introdurre 1 ml di eluato in 2 fiale di vetro ambrato distinte ed iniettare 100  $\mu$ l nel sistema HPLC per l'analisi di zearalenone e per l'analisi combinata di aflatossine totali ed ocratossina A.

## Informazioni sulla HPLC

### Preparazione del Campione

#### • Segale

1. Pesare 25 g di campione tritato in un contenitore per miscelatore resistente ai solventi dalla capacità di 1 litro.
2. Aggiungere 100 ml di acetonitrile al 60 % e mescolare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione utilizzando carta da filtro Whatman N. 113 oppure N. 4. In alternativa centrifugare a 4,000 rpm per 10 minuti.
4. Diluire 10 ml del filtrato con 40 ml di PBS.
5. Filtrare l'estratto diluito attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
6. Far passare 20 ml del filtrato (equivalente a 1 g di campione) attraverso la colonna con un flusso di 2 ml al minuto (in alternativa è possibile far passare la soluzione attraverso la colonna per gravità). Per la "cattura" della tossina da parte dell'anticorpo è essenziale applicare una pressione lenta e costante.
7. Lavare la colonna facendo passare 20 ml di PBS con un flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
8. Eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1.5 ml di metanolo al 100 % e raccoglierlo in una provetta di vetro da 5 ml. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. A seguito della eluizione, far passare 1.5 ml di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa provetta per avere un volume finale di 3 ml.
10. Introdurre 1 ml di eluato in 2 fiale di vetro ambrato distinte ed iniettare 100 µl nel sistema HPLC per l'analisi di zearalenone e per l'analisi combinata di aflatossine totali ed ocratossina A.

## Informazioni sulla HPLC

### Preparazione degli Standard

#### • Preparazione dello Standard di Aflatossine Totali da 1000 ng/ml

1. In alternativa, è possibile acquistare aflatossina B1, B2, G1 e G2 cristallina in polvere. Per maggiori informazioni potete contattare il distributore locale R-Biopharm. La polvere deve essere ricostituita seguendo le istruzioni fornite e lasciata per tutta la notte a temperatura ambiente e al buio per ottenere una soluzione stock.
2. Utilizzarla per preparare una soluzione stock da aflatossina B1, B2, G1 e G2 da 1000 ng/ml.

Nota: Il rapporto di B1, B2, G1 e G2 può variare in ciascuno standard. Si prega pertanto di far riferimento al rapporto indicato sullo standard acquistato.

#### • Preparazione dello Standard di Ocratossina da 1000 ng/ml

1. Presso R-Biopharm è disponibile OCHRSTANDARD (P11/P11A, 1000 ng/ml).

oppure

1. In alternativa è' possibile acquistare ocratossina A cristallina in polvere. Per maggiori informazioni potete contattare il distributore locale R-Biopharm. La polvere deve essere ricostituita seguendo le istruzioni fornite e lasciata per tutta la notte a temperatura ambiente e al buio per ottenere una soluzione stock concentrata.
2. Questa deve poi essere utilizzata per preparare una soluzione stock di ocratossina A da 1000 ng/ml.

#### • Preparazione dello Standard di Zearalenone da 1000 ng/ml

1. È possibile acquistare polvere cristallina di zearalenone. Contattare il distributore R-Biopharm locale per ulteriori informazioni. La polvere deve essere ricostituita secondo le istruzioni fornite e lasciata per una notte al buio a temperatura ambiente per avere una soluzione stock concentrata
2. Utilizzarla per preparare una soluzione stock da 1000 ng/ml di zearalenone.

## Informazioni sulla HPLC

### Curva di Calibrazione

Si raccomanda di costruire una curva di calibrazione di almeno 3 - 6 punti. In una curva ideale i livelli degli standard di calibrazione devono raggruppare o includere la gamma dei risultati attesi. La soluzione standard diluita deve essere preparata fresca nel giorno dell'analisi e deve essere utilizzata entro 24 ore.

#### • Diluizione dello Standard di Aflatossine Totali

1. Introdurre 1 ml di metanolo al 100 % in una fiala ambrata.
2. Rimuovere 100 µl e scartarli.
3. Aggiungere 100 µl dello standard di aflatossine totali da 1000 ng/ml per avere una soluzione di aflatossine totali da 100 ng/ml.

#### • Diluizione dello Standard di Ocratossina A

1. Introdurre 1 ml di metanolo al 100 % in una fiala ambrata.
2. Rimuovere 100 µl e scartarli.
3. Aggiungere 100 µl dello standard di ocratossina A da 1000 ng/ml per avere una soluzione di ocratossina A da 100 ng/ml.

#### • Diluizione dello Standard di Zearalenone

1. La soluzione standard di zearalenone da 1000 ng/ml può essere utilizzata tal quale, senza alcuna diluizione.

#### • Standard di lavoro combinato

Per la realizzazione di una curva di calibrazione a quattro punti:

1. Standard 4:
  - Prelevare 3 ml di metanolo al 100 % e scartare 780 µl.
  - Aggiungere 240 µl dello standard di aflatossine totali da 100 ng/ml, 240 µl dello standard di ocratossina A da 100 ng/ml e 300 µl dello standard di zearalenone da 1000 ng/ml.
  - Aggiungere 3 ml di acqua (equivalente a 4 ng/ml di aflatossina totale, 4 ng/ml di ocratossina A e 50 ng/ml di zearalenone). Mescolare tramite vortex per 20 secondi.
2. Standard 3: Prelevare 3 ml dello standard 4 e aggiungere 3 ml di metanolo al 50 % (equivalente a 2 ng/ml di aflatossina totale, 2 ng/ml di ocratossina A e 25 ng/ml di zearalenone).
3. Standard 2: Prelevare 3 ml dello standard 3 e aggiungere 3 ml di metanolo al 50 % (equivalente a 1 ng/ml di aflatossina totale, 1 ng/ml di ocratossina A e 12.5 ng/ml di zearalenone).
4. Standard 1: Prelevare 3 ml dello standard 2 e aggiungere 3 ml di metanolo al 50 % (equivalente a 0.5 ng/ml di aflatossina totale, 0.5 ng/ml di ocratossina A e 6.25 ng/ml di zearalenone).
5. Introdurre 1 ml di ciascuno standard i 2 fiale ambrate ed iniettare 100 µl di ciascuna soluzione nel sistema

## Informazioni sulla HPLC

### Raccomandazioni per HPLC

- Aflatossina Totale ed Ocratossina A**

HPLC Conditions			
Derivatisation	KOBRA® CELL at 100 µA setting		
Guard Cartridge	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm or (Hichrom) equivalent		
Analytical Column	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: Water : Methanol (55 : 45 v/v) Solution B: Water : Methanol (20 : 80 v/v) Add 119 mg of potassium bromide and 350 µl 4 M Nitric Acid to 1 litre of mobile phase A and B. Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	100	0
	14	100	0
	16	35	65
	30	35	65
	40	100	0
HPLC Pump	From preferred supplier		
Flow Rate	0.8 ml per minute		
Fluorescence Detector	Time (min)	Excitation (nm)	Emission (nm)
	0	365	442
	17	333	463
Column Heater	Maintain guard and analytical columns at 40 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	100 µl		
Elution Order	G2, G1, B2, B1, ochratoxin A		

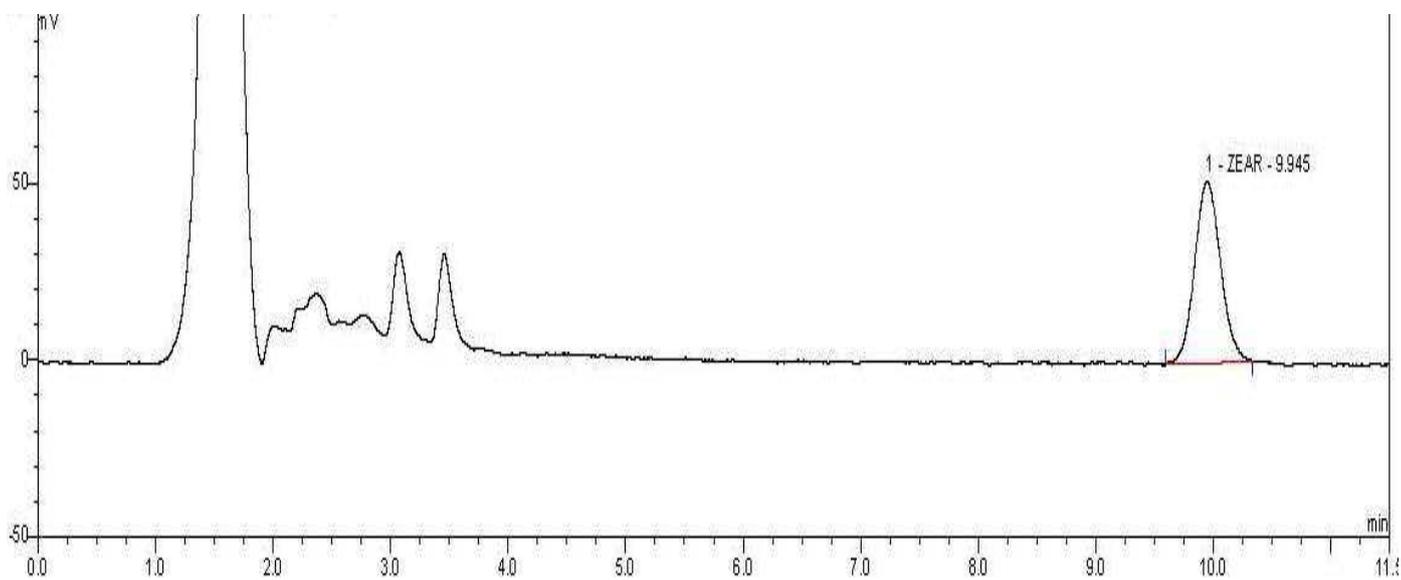
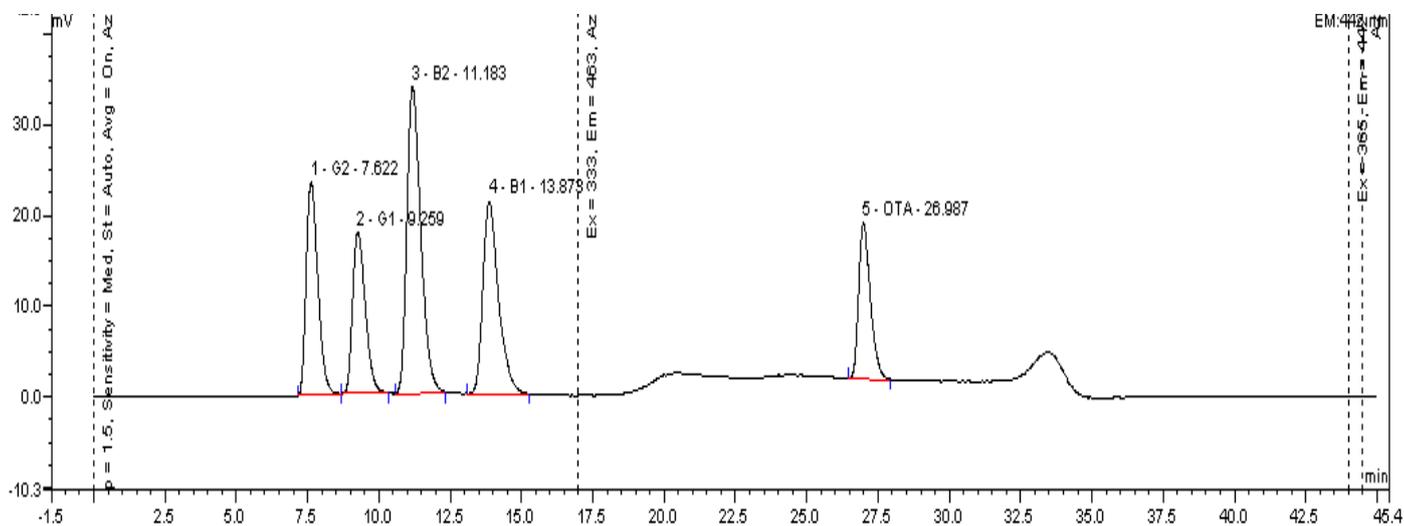
- Zearalenone**

HPLC Conditions	
Guard Cartridge	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm or (Hichrom) equivalent
Analytical Column	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) or equivalent
Mobile Phase	Acetonitrile : Water : Methanol (46 : 46 : 8 v/v) Prepare fresh on day of analysis.
HPLC Pump	To deliver mobile phase
Flow Rate	1.0 ml per minute
Fluorescence Detector	Excitation: 274 nm
	Emission: 455 nm
Column Heater	Maintain guard and analytical columns at 40 °C
Integrator / Data Control System	From preferred supplier
Injector	Autosampler / Rheodyne valve
Injection Volume	100 µl

# Informazioni sulla HPLC

## Esempio di cromatogramma HPLC

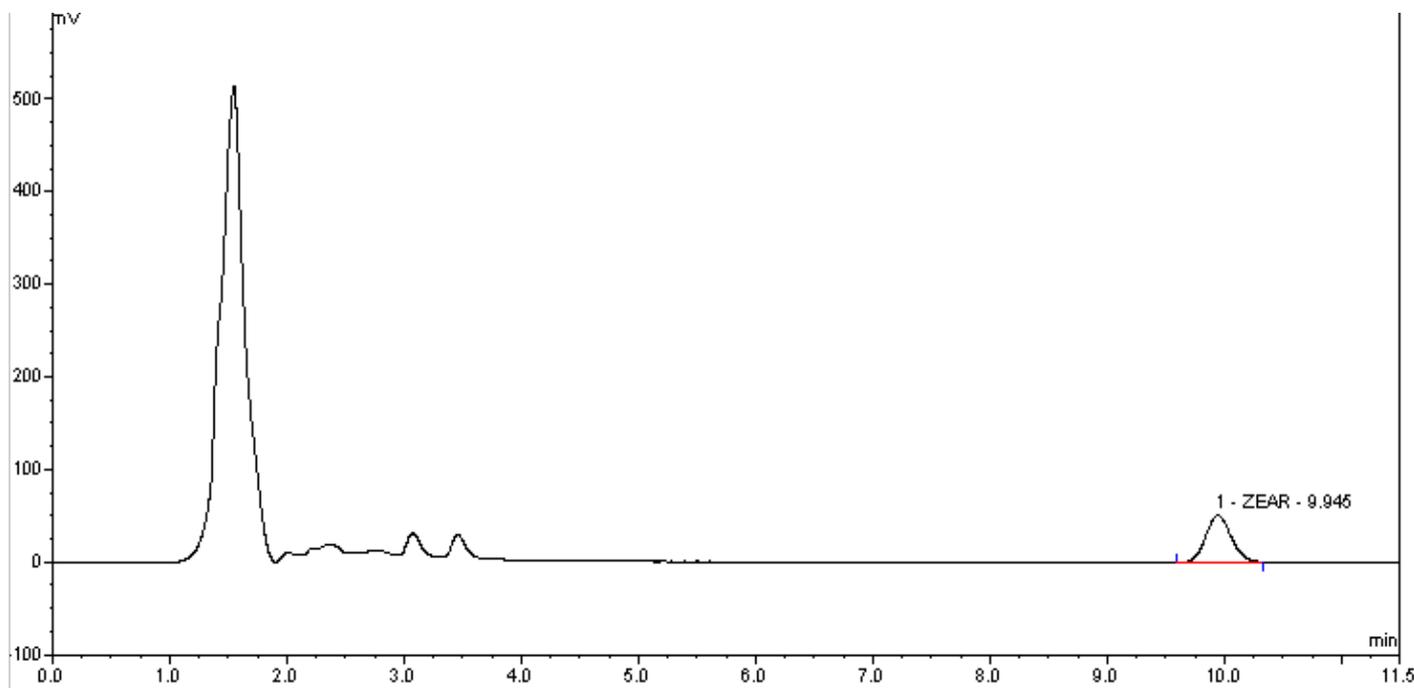
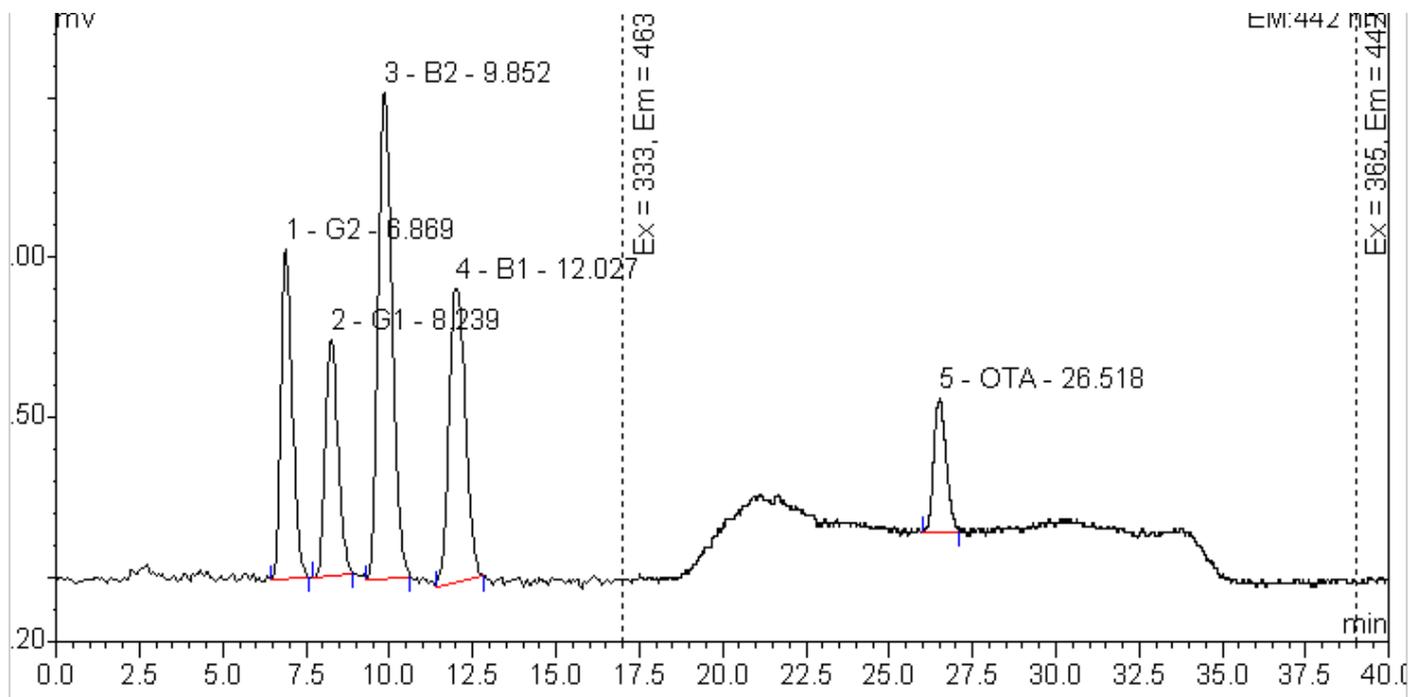
- Mais



# Informazioni sulla HPLC

## Esempio di cromatogramma HPLC

- Segale



## Informazioni sulla LC-MS/MS

### • Preparazione dei campioni: cereali

1. Pesare 25 g di campione macinato e 5 g di cloruro di sodio in un contenitore di miscelazione da 1 litro resistente ai solventi.
2. Aggiungere 100 ml di metanolo all'80% e miscelare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Centrifugare a 4.000 giri per 10 minuti.
4. Diluire 10 ml del filtrato con 40 ml di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).
5. Filtrare l'estratto diluito attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
6. Passare 20 ml di filtrato (equivalente a 1 g di campione) attraverso la colonna a una velocità di flusso di 2 ml al minuto (oppure lasciarlo scendere lungo la colonna per gravità). Per consentire all'anticorpo di catturare le tossine è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.
7. Lavare la colonna facendovi passare 20 ml di acqua con una velocità di flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
8. Eluire le tossine della colonna a una velocità di flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1,5 ml di metanolo al 100% e raccogliere in una fiala di vetro ambrata. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. Dopo l'eluizione far passare 1,5 ml d'acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa fiala per ottenere un volume totale di 3 ml.
10. Introdurre 25 µl nel sistema per LC-MS/MS

## Informazioni sulla LC-MS/MS

### • Preparazione dei campioni: segale

1. Pesare 25 g di campione macinato in un contenitore di miscelazione da 1 litro resistente ai solventi.
2. Aggiungere 100 ml di acetonitrile al 60% e miscelare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione attraverso carta da filtro Whatman n° 113 o n° 4 oppure centrifugare a 4.000 giri per 10 minuti.
4. Diluire 20 ml del filtrato con 80 ml di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).
5. Filtrare l'estratto diluito attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
6. Passare 20 ml di filtrato (equivalente a 1 g di campione) attraverso la colonna a una velocità di flusso di 2 ml al minuto (oppure lasciarlo scendere lungo la colonna per gravità). Per consentire all'anticorpo di catturare la tossina è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.
7. Lavare la colonna facendovi passare 20 ml di acqua con una velocità di flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
8. Eluire le tossine della colonna a una velocità di flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1,5 ml di metanolo al 100% e raccogliere in una fiala di vetro ambrata da 5 ml. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. Dopo l'eluizione far passare 1,5 ml d'acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa fiala per ottenere un volume totale di 3 ml.
10. Introdurre 25 µl nel sistema per LC-MS/MS.

## Informazioni sulla LC-MS/MS

### • Preparazione dei campioni: alimenti per neonati

1. Pesare 25 g di campione macinato e 5 g di cloruro di sodio in un contenitore di miscelazione da 1 litro resistente ai solventi.
2. Aggiungere 100 ml di metanolo all'80% e miscelare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Centrifugare a 4.000 giri per 10 minuti.
4. Diluire 15 ml del filtrato con 60 ml di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).
5. Filtrare l'estratto diluito attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
6. Passare 45 ml di filtrato (equivalente a 2,25 g di campione) attraverso la colonna a una velocità di flusso di 2 ml al minuto (oppure lasciarlo scendere lungo la colonna per gravità). Per consentire all'anticorpo di catturare la tossina è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.
7. Lavare la colonna facendovi passare 20 ml di acqua con una velocità di flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
8. Eluire le tossine della colonna a una velocità di flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1 ml di metanolo al 100% e raccogliere in una fiala di vetro ambrata da 5 ml. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. Dopo l'eluizione far passare 1 ml d'acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa fiala per ottenere un volume totale di 3 ml.
10. Introdurre 25 µl nel sistema per LC-MS/MS.

## Informazioni sulla LC-MS/MS

### Preparazione degli standard

- **Soluzione stock di aflatossine**

È consigliabile iniziare con una soluzione stock di aflatossine totali da 1.000 ng/ml.

**Nota:** il rapporto di B1, B2, G1 e G2 può variare in ogni standard. Annotare il rapporto corretto per lo standard acquistato.

- **Soluzione stock di ocratossina A**

È consigliabile iniziare con una soluzione stock di ocratossina A da 1000 ng/ml .

- **Soluzioni stock di zearalenone**

È consigliabile iniziare con una soluzione stock di zearalenone da 1000 ng/ml.

## Informazioni sulla LC-MS/MS

### Curva di calibrazione

- **Diluizione dello standard di aflatossine totali**

- **Diluizione dello standard di ocratossina A**

1. Misurare 1 ml di metanolo al 100% in una fiala ambrata.
2. Rimuovere 100 µl e scartarli.
3. Aggiungere 100 µl dello standard di ocratossina A da 1.000 ng/ml per ottenere una soluzione di ocratossina A da 100 ng/ml.

- **Diluizione dello standard di zearalenone**

1. La soluzione standard di zearalenone da 1000 ng/ml può essere utilizzata tal quale, senza ulteriori diluizioni.

- **Standard di lavoro combinato**

Si raccomanda di realizzare una curva di calibrazione di almeno 3-6 punti. Nella realizzazione di una curva di calibrazione adatta, i livelli degli standard di calibrazione devono raggruppare o includere la gamma dei risultati attesi. Le soluzioni standard diluite devono essere preparate fresche il giorno stesso dell'analisi e utilizzate entro 24 ore.

Esempio della preparazione di una curva di calibrazione a quattro punti (è possibile apportare variazioni in base alle norme di legge o ai livelli di contaminazione):

1. Standard 4:
  - Misurare 3 ml di metanolo al 100% in una fiala ambrata e scartarne 780 µl.
  - Aggiungere 240 µl dello standard di aflatossine totali da 100 ng/ml, 240 µl dello standard di ocratossina A da 100 ng/ml e 300 µl dello standard di zearalenone da 1000 ng/ml.
  - Aggiungere 3 ml d'acqua (equivalenti a 4 ng/ml di aflatossine totali, 4 ng/ml di ocratossina A e 50 ng/ml di zearalenone). Vorticare per 20 secondi.
2. Standard 3: prelevare 3 ml di standard 4 e aggiungere 3 ml di metanolo al 50% (equivalenti a 2 ng/ml di aflatossine totali, 2 ng/ml di ocratossina A e 25 ng/ml di zearalenone).
3. Standard 2: prelevare 3 ml dello standard 3 e aggiungere 3 ml di metanolo al 50% (equivalenti a 1 ng/ml di aflatossine totali, 1 ng/ml di ocratossina A e 12,5 ng/ml di zearalenone).
4. Standard 1: prelevare 3 ml dello standard 2 e aggiungere 3 ml di metanolo al 50% (equivalenti a 0,5 ng/ml di aflatossine totali, 0,5 ng/ml di ocratossina A e 6,25 ng/ml di zearalenone).
5. Pipettare 1 ml di ciascuno standard in una fiala ambrata e iniettare 25 µl di ciascuna soluzione nel sistema LC-MS/MS.

## Informazioni sulla LC-MS/MS

### • Raccomandazioni per la LC-MS/MS

#### Raccomandazioni per la LC

Colonna analitica	Phenomenex Gemini C18, 110 Å, 150 x 3 mm, 5 µm		
Fase mobile	Soluzione A: 1 mM di formiato di ammonio + acido formico allo 0,1% in Acqua: Metanolo (95: 05 v/v) Soluzione B: 1 mM di formiato di ammonio + acido formico allo 0,1% in Acqua: Metanolo (02: 98 v/v)		
Raccomandazioni per il gradiente	Tempo (min)	% soluzione A	% soluzione B
	0	80	20
	0,1	80	20
	10	10	90
	15	10	90
	15,1 20	80 80	20 20
Pompa per HPLC	Per la fase mobile		
Velocità di flusso	0,3 ml al minuto		
Riscaldatore colonna	Mantenere protezione e colonne analitiche a 40 °C		
Integratore / sistema di controllo dei dati	Del fornitore di preferenza		
Volume di iniezione	25 µl		

#### Raccomandazioni per la spettrometria di massa

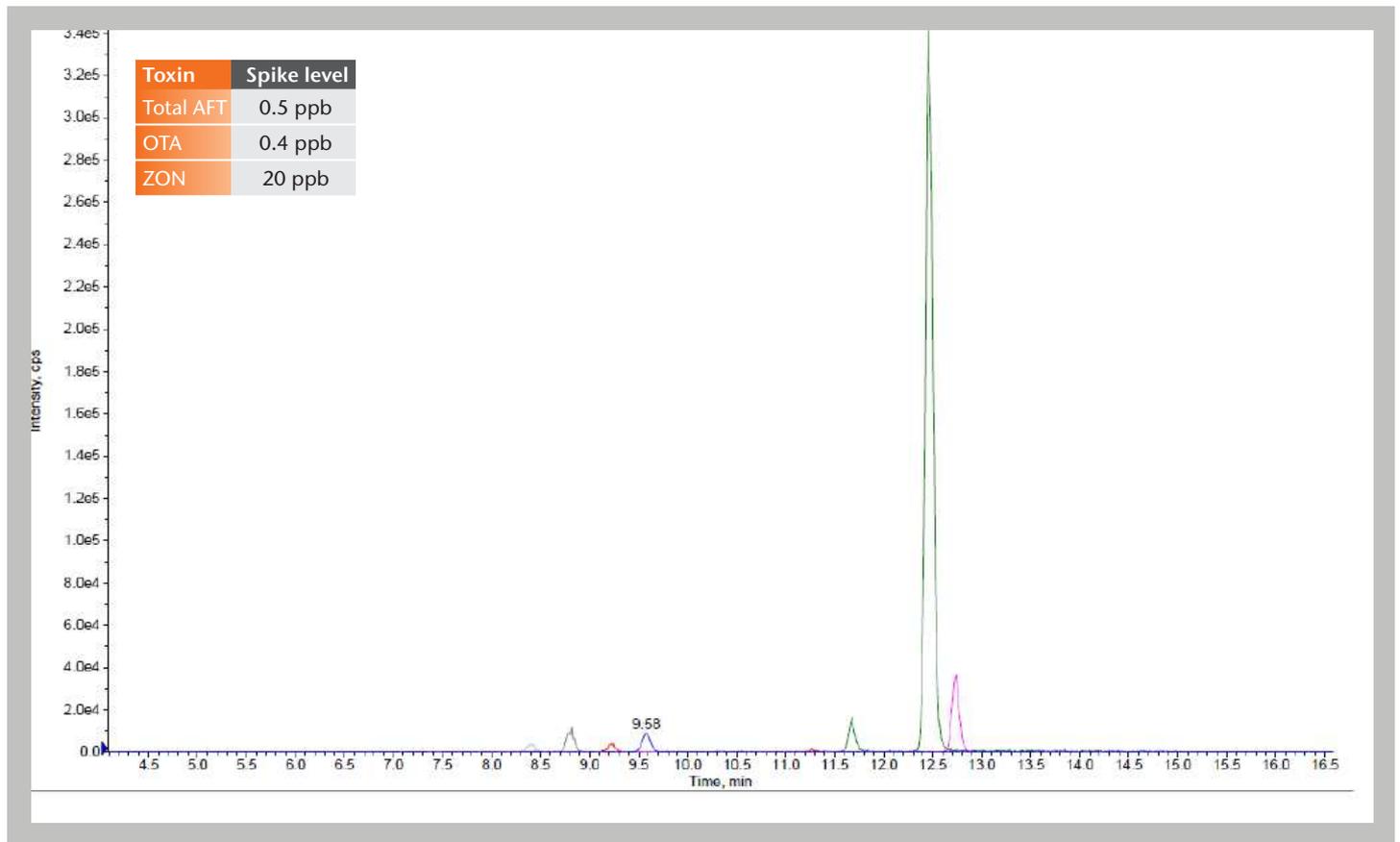
Dispositivo	Sciex QTRAP 4500
Modalità	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Temperatura sorgente	450 °C
Spray ionizzante	3500 V
Gas sorgente di ioni 1	50 psi
Gas sorgente di ioni 2	50 psi
Gas di cortina	50 psi

#### Impostazione dello strumento

Tossina	Segmento di tempo (min.)	Ione precursore (m/z)	Ioni prodotto (m/z)	Tempo di permanenza (s)	Energia di collisione (V)	Potenziale di uscita cella (V)
AFT G2	8,81	331,1 [M+H] <sup>+</sup>	256,90 (quantificatore) 189,10 (qualificatore)	20	40,90 54,40	20,00 14,00
AFT G1	8,81	329,1 [M+H] <sup>+</sup>	243,00 (quantificatore) 199,90 (qualificatore)	20	36,60 53,70	15,00 15,00
AFT B2	9,24	315,2 [M+H] <sup>+</sup>	287,10 (quantificatore) 259,00 (qualificatore)	20	34,90 38,60	17,00 17,00
AFT B1	9,59	313,2 [M+H] <sup>+</sup>	285,10 (quantificatore) 241,00 (qualificatore)	20	30,70 48,20	17,00 17,00
OTA	12,74	404,1 [M+H] <sup>+</sup>	239,00 (quantificatore) 358,00 (qualificatore)	20	31,20 19,10	15,00 18,00
ZON	12,47	319,1 [M+H] <sup>+</sup>	283,00 (quantificatore) 187,00 (qualificatore)	20	16,40 25,90	17,00 12,00

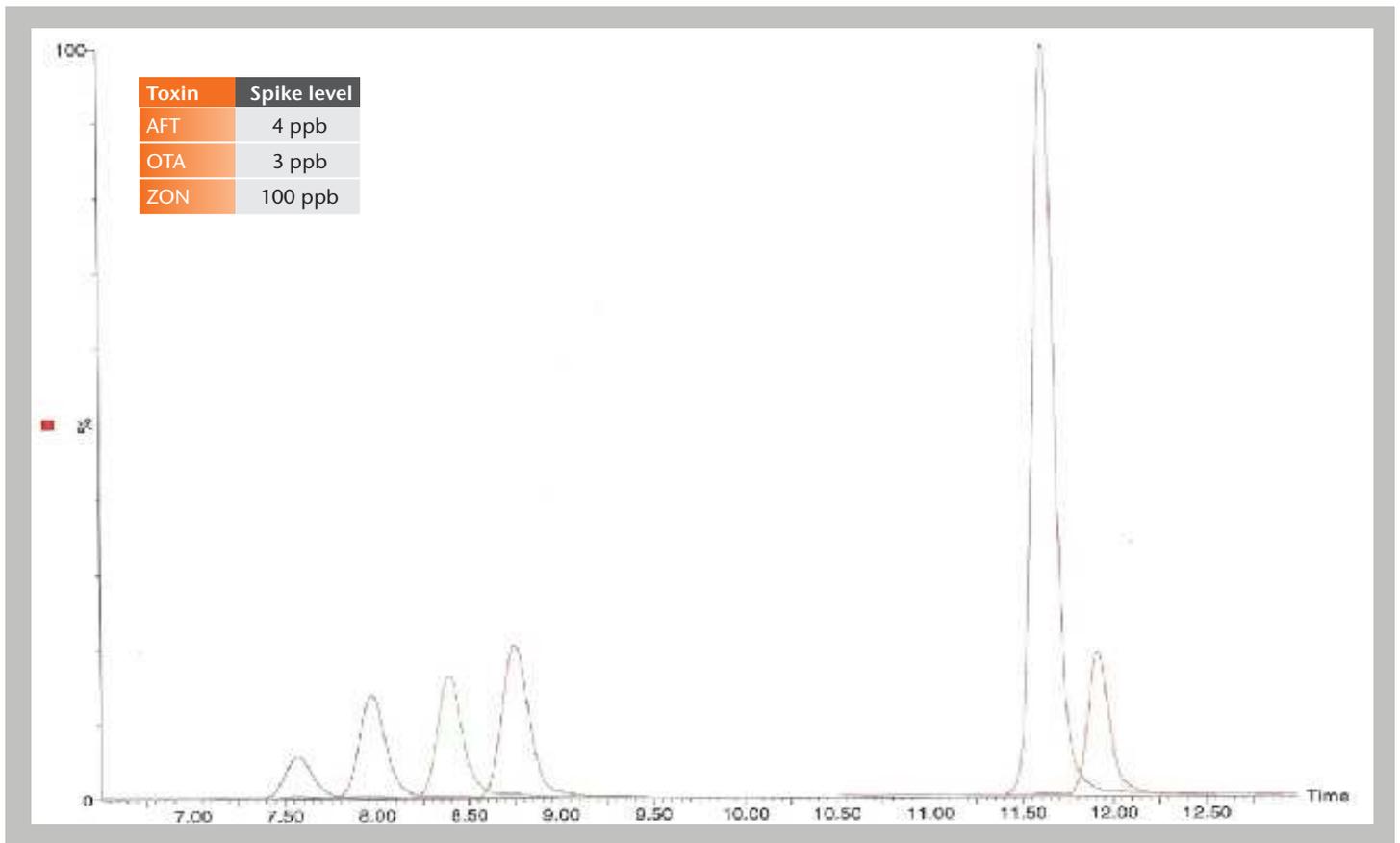
## Informazioni sulla LC-MS/MS: cromatogrammi tipici

### Esempio di cromatogramma LC-MS/MS per alimenti per neonati



## Informazioni sulla LC-MS/MS: cromatogrammi tipici

### Esempio di cromatogramma LC-MS/MS per la segale



## Qualità

I prodotti RBR sono sviluppati, prodotti, verificati e spediti in accordo con le normative dei sistemi registrati di gestione della qualità ISO 9001 e ISO 13485 che ne assicurano l'alta e costante qualità e la rispondenza ai requisiti di performance da noi stabiliti. I nostri prodotti sono stati impiegati in molti studi collaborativi per l'elaborazione di metodi standard europei e internazionali e sono largamente utilizzati dai principali enti, industrie alimentari e laboratori governativi. Referenze sui prodotti RBR per i clienti sono disponibili su richiesta.

## Supporto tecnico

Sensibile alle richieste di assistenza e suggerimenti che possono emergere da parte della clientela, RBR offre i seguenti servizi:

- Analisi dei campioni problematici
- Procedure per campioni difficili
- Referenze dalla letteratura della biblioteca RBR
- Installazione e supporto della KOBRA® CELL
- Consulenza per i parametri di rilevazione
- Consulenza per la preparazione e la manipolazione degli standard
- Aggiornamenti sulle normative e sulla preparazione dei campioni e altre notizie via e-mail
- Fornitura di campioni arricchiti

Contattare il rivenditore R-Biopharm di zona per ulteriori informazioni.

## Garanzia

R-Biopharm Rhône Ltd non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultasse difettosi, R-Biopharm Rhône Ltd si impegna a fornire prodotti sostitutivi. L'utilizzatore si assume qualsiasi rischio e responsabilità derivante dall'impiego dei prodotti e delle procedure R-Biopharm Rhône Ltd. R-Biopharm Rhône Ltd non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo dei prodotti o delle procedure R-Biopharm Rhône Ltd.



Prodotto da:  
**R-Biopharm Rhône Ltd**  
Scozia

Distribuito da:  
**R-Biopharm Italia Srl**  
Via Morandi, 10  
20077 Melegnano MI  
Tel: 02 9823 3330  
Fax: 02 9834 100  
info@r-biopharm.it