EASIMIP™ PATULIN

Cod. Prodotto: P250 / P250B

Colonne di polimeri ad impronta molecolare per l'uso in associazione all' HPLC.
Solo per uso in vitro.

P250B/V6/30.06.26

www.r-biopharm.com

R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Contenuto

Pag

Principio del Test ... 3
Reagenti Non Forniti ... 3
Prodotti Accessori ... 3
Rischi ... 3
Decontaminazione ... 4
Conservazione e Durata ... 4
Campionamento ... 4
Sensibilità ... 4
Recupero ... 4
Preparazione della Colonna ... 4
Preparazione del Campione ... 5
- Succo di Mela (Limpido) ... 5
- Succo di Mela (Torbido) ... 6
- Purea di Mela ... 7

Preparazione dello Standard ... 8
Curva di Calibrazione ... 8
Condizioni Raccomandate per l'HPLC ... 9
Tracciato Tipico dell' HPLC per l'Analisi di Patulina Mediante l'Uso delle Colonne ad Impronta Molecolare EASIMIP™ PATULIN ... 10
- Succo di Mela (Limpido) ... 10
- Succo di Mela (Torbido) ... 10
- Purea di Mela ... 10

Qualità ... 11
Supporto Tecnico ... 11
Garanzia ... 11

Principio del Test

La procedura si basa sulla tecnologia dei polimeri a impronta molecolare (MIP), che rende il test altamente specifico, sensibile, rapido e semplice da eseguire.

Le colonne contengono un polimero ad impronta molecolare specifico per la tossina di interesse. A seguito dell'estrazione della tossina, il campione estratto è centrifugato, filtrato e fatto passare lentamente attraverso la colonna MIP. L'eventuale tossina presente nel campione è trattenuta dal MIP all'interno della colonna. La colonna viene poi lavata per rimuovere tutto ciò che non si è legato e la tossina è rilasciata dalla colonna in seguito all'eluizione con un idoneo solvente. L'eluato viene poi raccolto prima dell'analisi in HPLC.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 45 minuti. Lo scopo è quello di migliorare la purificazione e la concentrazione della tossina da campioni alimentari per ottenere un cromatogramma più preciso.

Reagenti non Forniti

- Acqua distillata/deionizzata (adatta per HPLC, es. MilliQ)
- Solventi (Acetonitrile, etere dietilico e acetato di etile)
- Acido perclorico (60 %)
- Acido acetico
- Bicarbonato di sodio
- Pectinase (P129)*
- Patulin Standard (si prega di far riferimento alla sezione relativa alla preparazione dello standard)

Prodotti Accessori

- 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 vostro distributore locale.

Rischi

Le micotossine sono sostanze molto pericolose. L'analisi può essere eseguita solamente da laboratori attrezzati per la manipolazione di sostanze e solventi tossici. Durante l'esecuzione del saggio indossare abiti protettivi, inclusi guanti in lattice, occhiali protettivi e camici.

Conservare i solventi infiammabili in un armadietto antiesplosione. 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.

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 3 anni dalla data di produzione se conservate a 21 - 25 °C. Non congelare.

Campionamento

E' necessario ottenere un campione sufficientemente rappresentativo seguendo una delle procedure di campionamento ufficialmente riconosciute. Si raccomanda di triturare 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 diminuendo il volume del solvente utilizzato per ricostituire il campione eluito.

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 posso essere successivamente utilizzati per correggere i risultati ottenuti dall'analisi del campione.

Preparazione della Colonna

Fissare saldamente la colonna ad un serbatoio in vetro da siringa mediante adattatore, quindi inserirla nel supporto per colonne. Le colonne MIP richiedono un pre-condizionamento prima dell'uso, per maggiori informazioni far riferimento al paragrafo relativo alla preparazione del campione.

Preparazione del Campione

• Succo di Mela (Limpido)

Nota: Per spingere il liquido attraverso le colonne MIP è richiesto un serbatoio in vetro ed una pompa a siringa poiché il passaggio non avviene per gravità.

1. Introdurre 2.5 ml di campione in una provetta per centrifuga.

2. Aggiungere 2.5 ml di acido acetico al 2 %. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.

   Nota: Non lasciare asciugare le colonne durante la fase di condizionamento.

3. Per mettere nelle giuste condizioni la colonna, far passare 2 ml di acetonitrile al 100 % attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Lasciare uno strato sottile di acetonitrile sopra la sezione bianca della colonna.

4. Subito dopo, far passare 1 ml di acqua attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Lasciare uno strato sottile di acqua sopra la sezione bianca della colonna.

5. Far passare 4 ml del campione diluito (equivalente a 2 ml di campione) attraverso la colonna con un flusso di 0.5 ml al minuto (1 goccia ogni 2 secondi). Per la “cattura” della tossina è essenziale applicare un flusso lento e costante.

6. Lavare la colonna facendo passare 1 ml di bicarbonato di sodio all’1 % con un flusso di circa 1 ml al minuto (1 goccia al secondo) per rimuovere qualsiasi sale o componente polare della matrice.

7. Far passare 2 ml di acqua attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.

8. Sotto cappa, far passare 500 µl di etere dietilico al 100 % attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.

9. Sotto cappa, eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 2 ml di acetato di etile al 100 % e raccoglierlo in una provetta di vetro da 5 ml.

10. Aggiungere all’eluato 10 µl di acido acetico al 100 % . Mescolare tramite vortex per 20 secondi.

11. Far evaporare l'eluato con un flusso di azoto a 35 – 45 °C.

    Nota: Assicurarsi che l’eluato non si sia essiccato troppo perché questo può degradare la tossina.

12. Ricostituire con 1 ml di acido acetico allo 0.1 %. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.

13. Iniettare 100 µl dell’eluato ricostituito nel sistema HPLC.

Preparazione del Campione

• Succo di Mela (Torbido)

Nota: Per spingere il liquido attraverso le colonne MIP è richiesto un serbatoio in vetro ed una pompa a siringa poiché il passaggio non avviene per gravità.

1. Introdurre 20 ml di campione in una provetta per centrifuga.
2. Aggiungere 130 µl di enzima pectinasi. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.
3. Incubare per 2 ore a 40 °C o per tutta la notee a 21 – 25 °C.
4. Centrifugare il campione a 4.000 rpm per 10 minuti.
5. Filtrare il campione centrifugato attraverso un filtro da 0.2 µm per siringa (in cellulosa rigenerante), se necessario.

   Nota: Non lasciare asciugare le colonne durante la fase di condizionamento.
6. Aggiungere 2.5 ml di campione in una provetta per centrifuga.
7. Aggiungere 2.5 ml di acido acetico al 2 %. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.

   Nota: Non lasciare asciugare le colonne durante la fase di condizionamento.
8. Per mettere nelle giuste condizioni la colonna, far passare 2 ml di acetonitrile al 100 % attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Lasciare uno strato sottile di acetonitrile sopra la sezione bianca della colonna.
9. Subito dopo, far passare 1 ml di acqua attraverso la colonna con un flusso di 0.5 ml per minuto (1 goccia per secondo). Lasciare uno strato sottile di acqua sopra la sezione bianca della colonna.
10. Far passare 4 ml del campione diluito (equivalente a 2 ml di campione) attraverso la colonna con un flusso di 0.5 ml al minuto (1 goccia ogni 2 secondi). Per la “cattura” della tossina è essenziale applicare un flusso lento e costante.
11. Lavare la colonna facendo passare 1 ml di bicarbonato di sodio all’1 % con un flusso di circa 1 ml al minuto (1 goccia al secondo) per rimuovere qualsiasi sale o componente polare della matrice.
12. Far passare 2 ml di acqua attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
13. Sotto cappa, far passare 500 µl di etere dietilico al 100 % attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
14. Sotto cappa, eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 2 ml di acetato di etile al 100 % e raccoglierlo in una provetta di vetro da 5 ml.
15. Aggiungere all’eluato 10 µl di acido acetico al 100 % . Mescolare tramite vortex per 20 secondi.
16. Far evaporare l'eluato con un flusso di azoto a 35 – 45 °C.

    Nota: Assicurarsi che l’eluato non si sia essiccato troppo perché questo può degradare la tossina.
17. Ricostituire con 1 ml di acido acetico allo 0.1 %. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.
18. Iniettare 100 µl dell’eluato ricostituito nel sistema HPLC.

Preparazione del Campione

• Purea di Mela

Nota: Per spingere il liquido attraverso le colonne MIP è richiesto un serbatoio in vetro ed una pompa a siringa poiché il passaggio non avviene per gravità.

1. Pesare 10 g di campione in una provetta per centrifuga.
2. Aggiungere 150 µl di pectinasi e 10 ml di acqua. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.
3. Incubare per 2 ore a 40 °C o per tutta la notte a 21 - 25 °C.
4. Centrifugare il campione diluito a 4000 rpm per 10 minuti.
5. Filtrare il campione centrifugato attraverso un filtro per siringa da 0.2 µm (in cellulosa rigenerante).

   Nota: Non lasciare asciugare le colonne durante la fase di condizionamento.

6. Per mettere nelle giuste condizioni la colonna, far passare 2 ml di acetonitrile al 100 % attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Lasciare uno strato sottile di acetonitrile sopra la sezione bianca della colonna.
7. Subito dopo, far passare 1 ml di acqua attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Lasciare uno strato sottile di acqua sopra la sezione bianca della colonna.
8. Far passare 5 ml del filtrato (equivalente a 2.5 g di campione) attraverso la colonna con un flusso di 0.5 ml al minuto (1 goccia ogni 2 secondi). Per la "cattura" della tossina è essenziale applicare un flusso lento e costante.
9. Lavare la colonna facendo passare 4 ml di acido acetico all'1 % con un flusso di circa 1 ml al minuto (1 goccia al secondo). Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
10. Far passare 4 ml di acqua attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
11. Sotto cappa, far passare 500 µl di etere dietilico al 100 % attraverso la colonna con un flusso di 1 ml per minuto (1 goccia per secondo). Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
12. Sotto cappa, eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 2 ml di acetato di etile al 100 % e raccoglierlo in una provetta di vetro da 5 ml.
13. Aggiungere all'eluato 10 µl di acido acetico al 100 %. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.
14. Far evaporare l'eluato con un flusso di azoto a 35 - 45 °C.

    Nota: Assicurarsi che l'eluato non si sia essiccato troppo perché questo può degradare la tossina.

15. Ricostituire con 1 ml di acido acetico allo 0.1 %. Mescolare tramite vortex per 20 secondi.
16. Iniettare 100 µl dell'eluato ricostituito nel sistema HPLC.

Preparazione dello Standard

Preparazione di una soluzione stock di patulina 10.000 ng/ml:

1. E' possibile acquistare standard di patulina in polvere. Per maggiorni informazioni contattare il distributore locale R-Biopharm. La polvere è ricostituita secondo le istruzioni fornite e lasciata per tutta la notte al buio a temperatura ambiente per ottenere una soluzione stock concentrata.

2. Questa deve poi essere utilizzata per preparare una soluzione stock di patulina da 10.000 ng/ml.

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.

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

1. Standard 5: Prelevare 200 µl dei 10.000 ng/ml e portarli a 8 ml con acido acetico allo 0.1 % (equivalente a 250 ng/ml).

2. Standard 4: Prelevare 5 ml dei 200 ng/ml e aggiungere 5 ml di acido acetico allo 0.1 % (equivalente a 125 ng/ml).

3. Standard 3: Prelevare 2 ml dei 125 ng/ml e aggiungere 3 ml di acido acetico allo 0.1 % (equivalente a 50 ng/ml).

4. Standard 2: Prelevare 1 ml dei 50 ng/ml e aggiungere 1 ml di acido acetico allo 0.1 % (equivalente a 25 ng/ml).

5. Standard 1: Prelevare 1 ml dei 25 ng/ml e aggiungere 1 ml di acido acetico allo 0.1 % (equivalente a 12.5 ng/ml).

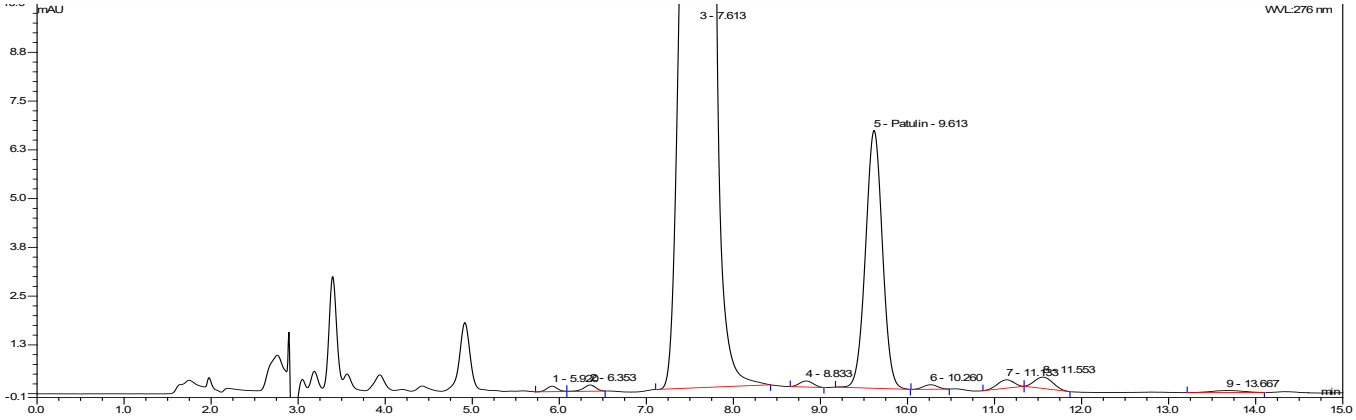
6. Iniettare 100 µl di ciascuno standard nel sistema HPLC.

Raccomandazioni per l'HPLC

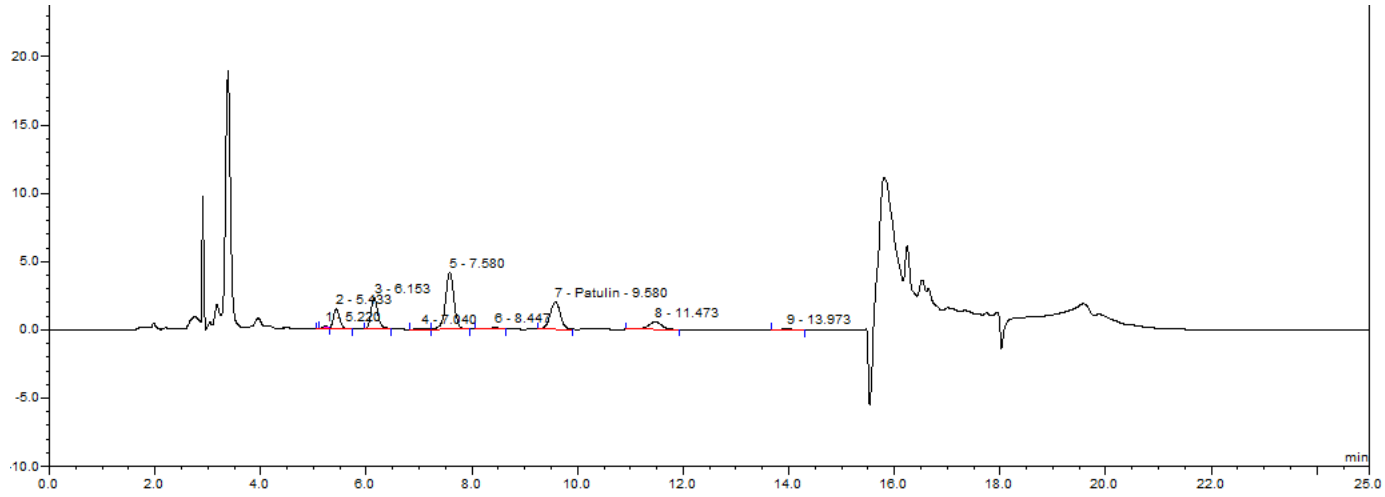
HPLC Conditions			
Guard Cartridge	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm or (Hichrom) equivalent		
Analytical Column	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: Water : Acetonitrile : 60 % Perchloric Acid (95 : 5 : 0.1 v/v/v) Solution B: Acetonitrile Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	100	0
	13	100	0
	13.1	20	80
	16	20	80
	16.1	100	0
	25	100	0
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	1.0 ml per minute		
UV Detector	276 nm		
Column Heater	Maintain guard and analytical columns at 30 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	100 µl		

Tracciato Tipico dell' HPLC per l'Analisi di Patulina Mediante l'Uso delle Colonne ad Impronta Molecolare EASIMIP™ PATULIN

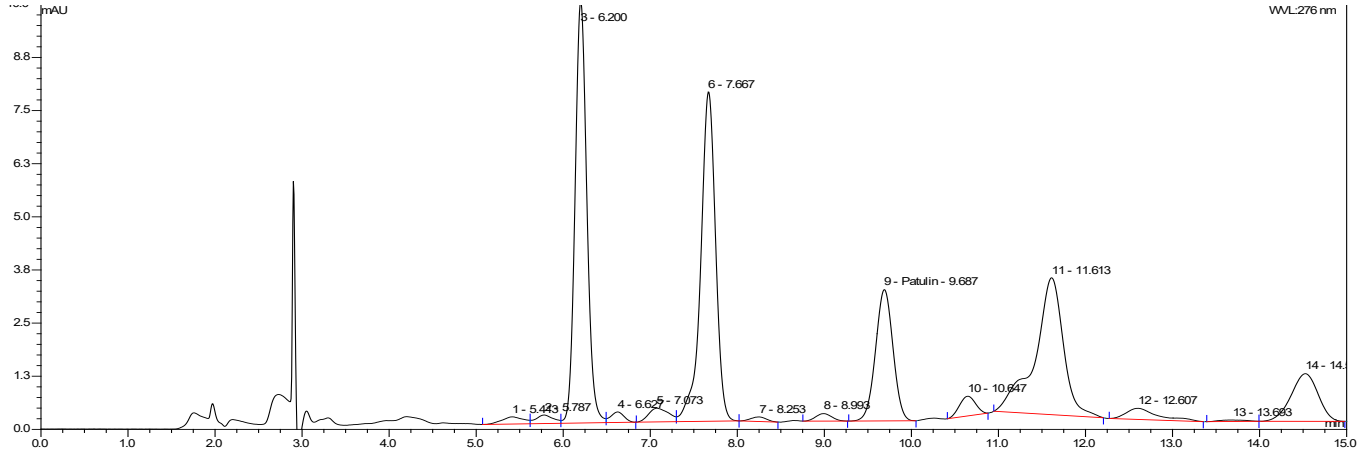
- **Succo di Mela (Limpido)**



- **Succo di Mela (Torbido)**



- **Purea di Mela**



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 s pese 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