

FUMONIPREP[®]

Codice prodotto: DP31 / P31B

Colonne di immunoaffinità per l'uso in associazione all'HPLC o LC-MS/MS.
Solo per uso in vitro.

P31/V19/27.05.22

Indice

	Pagina
Principio del test	4
Reagenti non forniti	4
Prodotti accessori	4
Metodi raccomandati e note applicative	4
Rischi	5
Decontaminazione	5
Conservazione e durata	5
Campionamento	5
Sensibilità	5
Recuperi	5
Preparazione delle colonne	6
Eluizione	6
Derivatizzazione prima della rivelazione con HPLC	7
• Preparazione del tampone borato 0,1 M	7
• Preparazione del reagente OPA (con mercaptoetanololo o 1-tioglicerolo)	7
• Programmazione dell'autocampionatore	7
Preparazione dei campioni	8
• Cereali	8
Preparazione degli standard	9
• Soluzione stock di fumonisina	9
Curva di calibrazione	9
Condizioni raccomandate per l'HPLC	10
Esempio di cromatogramma HPLC	10
• Mais	10
Condizioni raccomandate per LC-MS/MS	11
Esempio di cromatogramma LC-MS/MS	12
• Mais	12
Qualità	13
Assistenza tecnica	13
Garanzia	13

Principio del test

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

Le colonne contengono una sospensione in gel di anticorpi monoclonali specifici per le tossine di interesse. Successivamente all'estrazione delle tossine il campione estratto viene filtrato, diluito e fatto passare lentamente attraverso la colonna di immunoaffinità. Tutte le tossine presenti nel campione vengono trattenute dall'anticorpo all'interno della sospensione in gel. La colonna viene lavata per rimuovere tutto il materiale non legato e le tossine vengono poi rilasciate dalla colonna a seguito di eluizione con solvente. L'eluato viene raccolto prima dell'analisi mediante HPLC o LC-MS/MS. Quando sono analizzate mediante HPLC, le fumonisine devono essere derivatizzate.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 30 minuti. Ne risulta un miglioramento della purificazione e della concentrazione delle tossine dai campioni di alimenti e mangimi ottenendo un cromatogramma più preciso e quindi un rilevamento più accurato e sensibile. Le colonne hanno anche l'ulteriore vantaggio di poter essere automatizzate per analisi di campioni su vasta scala.

Reagenti non forniti

Per i metodi HPLC e LC-MS/MS:

- Acqua distillata / deionizzata (adatta per l'uso con HPLC, ad es. MilliQ)
- Solventi (metanolo e acetonitrile per HPLC)
- Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) (RP202)*
- Fumonisina standard B1 e B2 (fare riferimento alla sezione Preparazione degli standard)
- Cloruro di sodio
- Diidrogenofosfato di sodio

Solo per i metodi HPLC:

- Tetraborato di disodio
- Acido o-fosforico (H_3PO_4) >85%
- O-ftaldialdeide (OPA)
- 1-tioglicerolo

Prodotti accessori

- Carta da filtro Whatman N. 113 o N. 4
- Carta da filtro in microfibra di vetro
- Rack per colonne di immunoaffinità (CR1)*
- Pacchetto di accessori per colonne di immunoaffinità (AP01)*

* Disponibile presso R-Biopharm. Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm locale.

Metodi raccomandati e note applicative

Sono disponibili metodi per tutte le matrici a norma di legge nonché per altri prodotti. Eventuali variazioni dei metodi descritti nelle nostre Istruzioni per l'uso e Note applicative potrebbero non garantire risultati ottimali. Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm locale.

Rischi

Le micotossine sono sostanze molto pericolose. Le analisi devono essere eseguite solo da laboratori attrezzati per il trattamento di materiali e solventi tossici. Durante l'analisi è necessario indossare indumenti protettivi adatti, fra cui guanti, occhiali di sicurezza e camici da laboratorio.

Conservare i solventi infiammabili in un armadietto antiesplorazione. Operare sotto cappa chimica e utilizzare attrezzature protettive secondo necessità.

Qualora servano ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm locale per richiedere la scheda dei dati di sicurezza.

Decontaminazione

Prima dello smaltimento, le soluzioni standard in eccesso devono essere trattate con almeno un decimo del loro volume di ipoclorito di sodio al 5%. Immergere l'attrezzatura di laboratorio e il materiale residuo contaminato in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5% per 30 minuti, poi aggiungere acetone al 5% e tenere in ammollo per altri 30 minuti. Lavare con abbondante acqua prima dello smaltimento. Dopo la decontaminazione lavare scrupolosamente l'attrezzatura di laboratorio utilizzata. Incenerire i rifiuti se consentito dai regolamenti.

Conservazione e durata

Le colonne hanno una durata di 18 mesi dalla data di produzione se conservate a 2–8 °C o 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. È importante tenere presente che gli anticorpi contenuti nelle colonne di immunoaffinità possono essere denaturati da estreme variazioni di temperatura o pH.

Campionamento

È necessario ottenere un campione 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 (5–50 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 di immunoaffinità. Notare che è necessario mantenere il rapporto fra solvente e soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).

Recuperi

Se un analista desidera tener conto delle perdite che possono avvenire durante l'estrazione, si raccomanda di analizzare un campione arricchito dello stesso tipo di prodotto del materiale testato seguendo la procedura completa come per uno standard di riferimento. I valori di recupero ottenuti con il campione arricchito possono essere utilizzati per correggere i risultati ottenuti dall'analisi del campione.

Preparazione delle colonne

Le colonne di immunoaffinità devono essere a temperatura ambiente prima dell'uso. Rimuovere il tappo dall'estremità superiore della colonna e smaltire. Fissare saldamente la colonna a una siringa di vetro con un adattatore e collocarla in un rack per colonne di immunoaffinità o in un 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 garantisce 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: -

Backflushing (metodo preferito da R-Biopharm): lavare in controcorrente 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.



Derivatizzazione prima della rivelazione con HPLC

• Preparazione del tampone borato 0,1 M

Il tampone deve essere preparato lo stesso giorno dell'analisi.

1. Pesare 3,8 g di tetraborato di sodio decaidrato in un vaso di vetro.
2. Riempire fino a 100 ml con acqua.

• Preparazione del reagente OPA (con mercaptoetanolo o 1-tioglicerolo)

Il reagente può essere conservato per un massimo di 5 giorni se tenuto a 2–8 °C. Deve essere utilizzato lo stesso reagente durante tutta la procedura.

1. Pesare 120 mg di OPA in un vaso di vetro.
2. Aggiungere 3 ml di metanolo al 100%, 15 ml di tampone borato e 150 µl di mercaptoetanolo oppure 179 µl di 1-tioglicerolo.
3. Lasciare per una notte al buio a temperatura ambiente.

• Programmazione dell'autocampionatore

Nota: È importante introdurre gli standard e gli eluati del campione nell'HPLC entro 3 minuti se contengono il reagente OPA con mercaptoetanolo o entro 10 minuti se contengono il reagente OPA con 1-tioglicerolo. Al fine di ridurre la variabilità, si raccomanda inoltre di mantenere costante il periodo di tempo successivo all'aggiunta dell'OPA e all'introduzione nell'HPLC per i campioni e per gli standard.

Il programma è impostato in modo che sia posta una fiala vuota in una posizione dell'autocampionatore precedente a quella della soluzione campione; ad es., per la prima introduzione di un ciclo, la fiala per la miscela viene posta nella posizione 1, mentre la soluzione del campione da introdurre nella fiala per la miscela si trova nella posizione 2 sull'autocampionatore.

1. 200 µl di reagente OPA vengono introdotti nella fiala di miscelazione.
2. 200 µl di eluato vengono introdotti nella fiala di miscelazione.
3. 200 µl di miscela vengono prelevati e dispensati 3 volte.
4. 100 µl di campione derivatizzato vengono introdotti nel sistema.

Preparazione dei campioni

• Cereali

Questo metodo è stato verificato su numerosi cereali, fra cui grano, orzo, mais, farina di mais, popcorn, fiocchi di mais e altri prodotti a base di cereali.

1. Pesare 25 g di campione e 5 g di cloruro di sodio in un contenitore di miscelazione da 1 litro resistente al solvente.
2. Aggiungere 125 ml di acetonitrile : metanolo : acqua (25 : 25 : 50 v/v/v) e miscelare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare l'estratto attraverso la carta da filtro Whatman N. 113 o N. 4 oppure centrifugare a 4.000 giri/min. 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. Far passare 10 ml del filtrato diluito (equivalente a 0,4 g di campione) attraverso la colonna con una velocità di flusso di 2 ml al minuto (oppure, se lo si preferisce, è possibile far passare il campione attraverso la colonna per gravità). Per consentire all'anticorpo di catturare le tossine è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.
7. **HPLC:** Lavare la colonna con 10 ml di PBS.
LC-MS/MS: Lavare la colonna con 20 ml di acqua.
La colonna deve essere lavata con una velocità di flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare l'aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
8. Eluire le tossine dalla 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 di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa fiala per un volume totale di 3 ml.

HPLC

10. Aggiungere 200 µl di eluato a 200 µl di reagente OPA. Programmare l'autocampionatore per eseguire la derivatizzazione del campione. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Programmazione dell'autocampionatore.
11. Introdurre 100 µl nel sistema HPLC.

LC-MS/MS

10. Introdurre 50 µl nel sistema per LC-MS/MS.

Preparazione degli standard

• Soluzione stock di fumonisina

È consigliabile iniziare con una soluzione stock di fumonisina (FB1 e FB2) da 100.000 ng/ml.

Nota: il rapporto tra FB1 e FB2 può variare in ciascuno standard. Notare il rapporto corretto per lo standard acquistato.

Curva di calibrazione

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

Esempio di preparazione di una curva di calibrazione (è possibile apportare variazioni in base ai requisiti normativi o ai livelli di contaminazione):

1. Misurare 7,5 ml di metanolo al 50% in una fiala ambrata.
2. Rimuovere 300 µl e scartarli.
3. Aggiungere 300 µl di soluzione standard di fumonisina totale da 100.000 ng/ml per ottenere una soluzione di fumonisina totale da 4.000 ng/ml.

HPLC:

4. Standard 3: Prelevare 500 µl dalla soluzione di fumonisina totale da 4.000 ng/ml e aggiungere 1,5 ml di metanolo al 50% (equivalente a 1.000 ng/ml).
5. Standard 2: Prelevare 1 ml dello standard 3 e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 500 ng/ml).
6. Standard 1: Prelevare 1 ml dello standard 2 e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 250 ng/ml).
7. Aggiungere 200 µl di ciascuno standard a 200 µl di reagente OPA. Programmare l'autocampionatore per eseguire la derivatizzazione di ciascuna soluzione. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Programmazione dell'autocampionatore.
8. Introdurre 100 µl di ciascuna soluzione nel sistema HPLC.

LC-MS/MS:

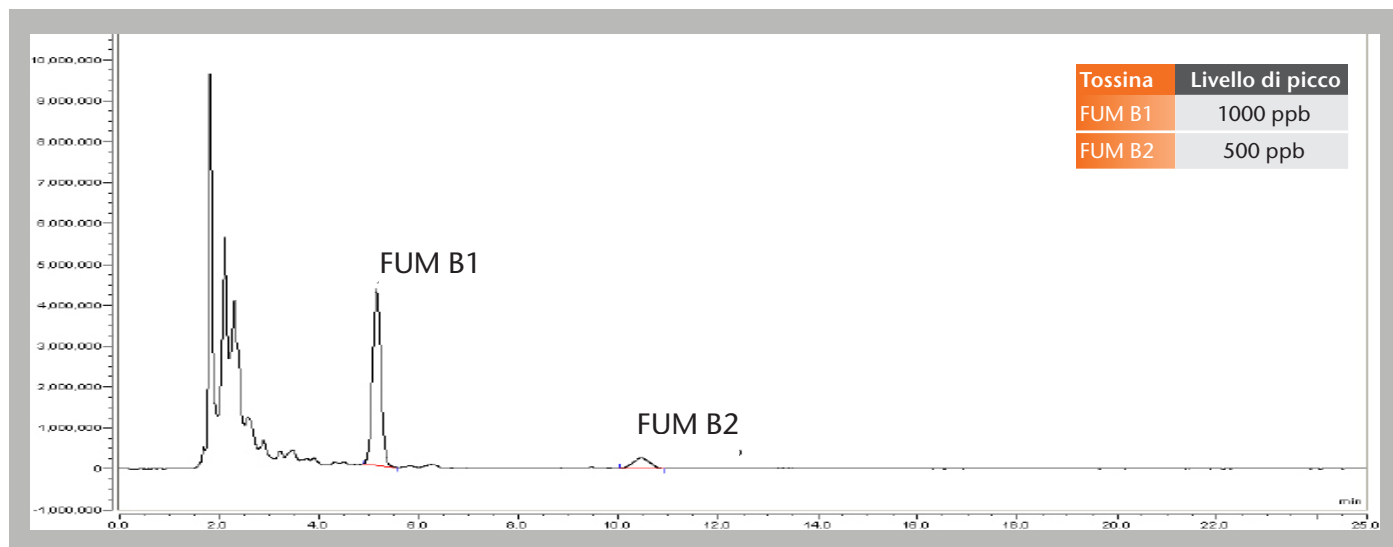
4. Standard 5: Prelevare 500 µl dalla soluzione di fumonisina totale da 4.000 ng/ml e aggiungere 1,5 ml di metanolo al 50% (equivalente a 1.000 ng/ml).
5. Standard 4: Prelevare 1 ml dello standard 5 e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 500 ng/ml).
6. Standard 3: Prelevare 1 ml dello standard 4 e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 250 ng/ml).
7. Standard 2: Prelevare 1 ml dello standard 3 e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 125 ng/ml).
8. Standard 1: Prelevare 1 ml dello standard 2 e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 62,5 ng/ml).
9. Introdurre 50 µl di ciascuna soluzione nel sistema LC-MS/MS.

Condizioni raccomandate per l'HPLC

Condizioni per HPLC	
Derivatizzazione	Reagente OPA
Cartuccia di protezione	Cartuccia C18 a fase inversa disattivata o equivalente 10 mm x 4,6 mm d.i.
Colonna analitica	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4,6 mm x 150 mm (Hichrom) o equivalente
Fase mobile	Metanolo : diidrogenofosfato di sodio 0,1 M (77 : 23 v/v) Aggiungere 11,998 g di fosfato di sodio a 1 l di acqua per ottenere una soluzione 0,1 M. Regolare il pH a 3,3 con acido o-fosforico. Preparare fresca il giorno dell'analisi.
Pompa HPLC	Per la fase mobile
Velocità di flusso	1,0 ml al minuto
Rilevatore a fluorescenza	Eccitazione: 335 nm Emissione: 440 nm
Riscaldatore colonna	Mantenere protezione e colonne analitiche a 40 °C
Integratore / sistema di controllo dei dati	Del fornitore di preferenza
Iniettore	Autocampionatore / valvola Rheodyne
Volume di iniezione	100 µl

Esempio di cromatogramma HPLC

- Mais



Condizioni raccomandate per la LC-MS/MS

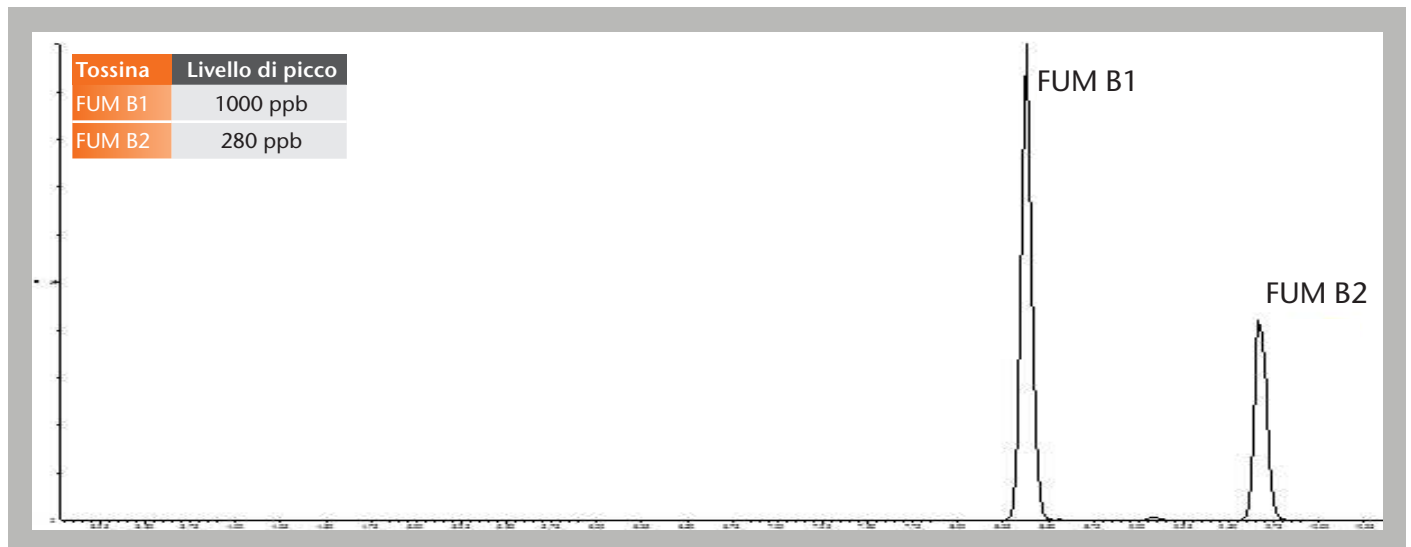
Condizioni per LC			
Colonna analitica	Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 A, 150 mm x 3 mm o equivalente		
Fase mobile	Fase mobile A: Formiato di ammonio 1 mM e acido formico allo 0,1% in metanolo al 5% Fase mobile B: Formiato di ammonio 1 mM e acido formico allo 0,1% in metanolo al 98% Preparare fresca il giorno dell'analisi.		
Condizioni per il gradiente	Tempo (min)	% soluzione A	% soluzione B
	0	80	20
	0,1	80	20
	10	10	90
	15	10	90
	15,1	80	20
	20	80	20
Pompa HPLC	Per la fase mobile		
Velocità di flusso	0,3 ml al minuto		
Riscaldatore colonna	Mantenere la colonna analitica a 40 °C		
Integratore / sistema di controllo dei dati	Del fornitore di preferenza		
Iniettore	Autocampionatore / valvola Rheodyne		
Volume di iniezione	50 µl		

Condizioni per la spettrometria di massa	
Dispositivo	Rilevatore Waters® ACQUITY TQ con ionizzazione elettrospray
Modalità	Modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM) con polarità positiva
Tensione capillare	+1.500 volt
Temperatura sorgente	150 °C
Temperatura gas di desolvatazione	350 °C
Flusso del gas di desolvatazione	600 l/ora (N)
Flusso del gas del cono	50 l/ora (N)

Impostazione del dispositivo						
Tossina	Segmento di tempo (min.)	Ione precursore (m/z)	Ioni prodotto (m/z)	Tempo di permanenza (s)	Tensione cono (V)	Tensione di collisione (eV)
Fumonisina B1	6,5–9,5	722,39 [M+H] ⁺	334,39 (quantificatore)	0,105	52	40
			352,40 (qualificatore)		52	38
Fumonisina B2	8,5–10,5	706,39 [M+H] ⁺	336,40 (quantificatore)	0,105	56	40
			318,39 (qualificatore)		56	42

Esempio di cromatogramma LC-MS/MS

- Mais



Qualità

I prodotti RBR sono sviluppati, fabbricati, verificati e spediti secondo un sistema di gestione della qualità a norma ISO 9001, che garantisce ripetibilità e conformità alle nostre specifiche prestazionali. I nostri prodotti sono stati impiegati in molti studi collaborativi per lo sviluppo di metodi standard europei e internazionali e sono ampiamente utilizzati dai principali enti, da aziende del settore alimentare e da laboratori statali. Le referenze dei clienti che utilizzano i prodotti RBR sono disponibili su richiesta.

Assistenza tecnica

In RBR siamo consapevoli che talvolta gli utenti dei nostri prodotti possono avere bisogno di assistenza e suggerimenti. A tale scopo offriamo ai nostri clienti i seguenti servizi:

- Analisi dei campioni problematici.
- Procedure per campioni difficili.
- Riferimenti della libreria RBR.
- Installazione di KOBRA® CELL e relativo supporto.
- Consulenza per i parametri di rilevazione.
- Consulenza per la preparazione e manipolazione degli standard.
- Aggiornamenti sulle normative, sul campionamento e altre notizie via e-mail.
- Fornitura di campioni arricchiti.

Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm locale.

Garanzia

R-Biopharm Rhône Ltd non fornisce alcuna garanzia, implicita o esplicita, oltre a quella relativa all'idoneità qualitativa dei materiali di cui sono costituiti tutti i prodotti realizzati da R-Biopharm Rhône Ltd. Se uno qualsiasi di detti materiali risulta difettoso, R-Biopharm Rhône Ltd fornirà un prodotto di ricambio. L'utente si assume qualsiasi rischio e responsabilità derivante dall'utilizzo dei prodotti e delle procedure di R-Biopharm Rhône Ltd. R-Biopharm Rhône Ltd non sarà ritenuta responsabile per eventuali danni, compresi danni speciali o conseguenti, perdite o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo dei prodotti e delle procedure di R-Biopharm Rhône Ltd.

