

DONPREP[®]

Codice prodotto: P50 / P50B

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

P50/V18/27.05.22

www.r-biopharm.com



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Indice

Pagina

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
Recuperi	5
Preparazione delle colonne	5
Eluizione	6
Preparazione dei campioni	7
• Cereali	7
• Mangime per animali	8
Preparazione degli standard	9
Curva di calibrazione	9
• Per HPLC	9
• Per LC-MS/MS	9
Condizioni raccomandate per l'HPLC	10
Esempi di cromatogrammi HPLC	11
• Cereali (arricchiti a 1250 ppb)	11
• Mangime per animali (arricchito a 5000 ppb)	11
Condizioni raccomandate per LC-MS/MS	12
Esempi di cromatogrammi LC-MS/MS	13
• Cereali (arricchiti a 20 ppb)	13
• Mangime per animali (arricchito a 5000 ppb)	13
Qualità	14
Assistenza tecnica	14
Garanzia	14

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 la tossina di interesse. Successivamente all'estrazione della tossina il campione estratto viene filtrato, diluito e fatto passare lentamente attraverso la colonna di immunoaffinità. L'eventuale tossina presente nel campione viene trattenuta dall'anticorpo all'interno della sospensione in gel. La colonna viene lavata per rimuovere tutto il materiale non legato e la tossina viene poi rilasciata dalla colonna a seguito di eluizione con solvente. L'eluato viene raccolto e sottoposto a evaporazione e ricostituito prima dell'analisi mediante HPLC o LC-MS/MS.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 20 minuti. Ne risulta un miglioramento della purificazione e della concentrazione della tossina dai campioni di alimenti e mangimi ottenendo un cromatogramma più preciso e quindi una rivelazione più accurata e sensibile. Le colonne hanno anche l'ulteriore vantaggio di poter essere automatizzate per analisi di campioni su vasta scala.

Reagenti non forniti

- Acqua distillata / deionizzata (adatta per l'uso con HPLC, ad es. MilliQ)
- Solventi (metanolo e acetonitrile per HPLC)
- Deossinivalenolo standard (fare riferimento alla sezione Preparazione degli standard)
- Idrossido di sodio (pH filtrato se richiesto)
- Cloruro di sodio

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.

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.

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.

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.



Preparazione dei campioni

• Cereali

Questo metodo è stato verificato su numerosi cereali, fra cui grano, orzo, mais e prodotti a base di 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 200 ml di acqua e miscelare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione attraverso la carta da filtro Whatman N. 113 o N. 4 oppure centrifugare a 4.000 giri/min. per 10 minuti.
4. Filtrare attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
5. Far passare 2 ml del filtrato (equivalente a 0,25 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 la tossina è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.
6. Lavare la colonna facendovi passare 10 ml di acqua con una velocità di flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare l'aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
7. Eluire la tossina 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 adeguata. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.

HPLC

8. Far evaporare completamente l'eluato sotto aria a 60–70 °C.
9. Ricostituire con 1 ml di metanolo al 15%. Miscelare su agitatore a vortice per 20 secondi.
10. Introdurre 100 µl di eluato ricostituito nel sistema HPLC.

LC-MS/MS:

8. Dopo l'eluizione far passare 1,5 ml di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nello stesso recipiente per un volume totale di 3 ml.
9. Introdurre 10 µl di eluato nel sistema per LC-MS/MS.

Preparazione dei campioni

• Mangime per animali

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 200 ml di acqua e miscelare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Centrifugare il campione a 4.000 giri/min. per 10 minuti.
4. Regolare il pH a circa 7,4 con idrossido di sodio 2 M.
5. Filtrare il surnatante attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
6. Se si effettua l'analisi a livelli di 6.000 ppb o inferiori, far passare 2 ml del filtrato (equivalente a 0,25 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 la tossina è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.

o

Se si effettua l'analisi a livelli maggiori di 6.000 ppb, diluire 2 ml di filtrato con 2 ml d'acqua.

Far passare 2 ml del filtrato diluito (equivalente a 0,125 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 la tossina è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.

7. Lavare la colonna facendovi passare 10 ml di acqua 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 la tossina 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 adeguata. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.

HPLC:

9. Far evaporare completamente l'eluato sotto aria a 60–70 °C.
10. Ricostituire con 1 ml di metanolo al 15%. Miscelare su agitatore a vortice per 20 secondi.
11. Introdurre 100 µl di eluato ricostituito nel sistema HPLC.

LC-MS/MS:

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.
10. Introdurre 10 µl di eluato nel sistema per LC-MS/MS.

Preparazione degli standard

È consigliabile iniziare con una soluzione stock di deossinivalenolo da 100.000 ng/ml.

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 un periodo di 24 ore.

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

HPLC:

1. Aggiungere 200 µl di standard cristallizzato ricostituito a 800 µl di acetonitrile al 100% (equivalente a 20.000 ng/ml).
2. Far evaporare completamente 200 µl di soluzione sotto aria a 60–70 °C.
3. Standard 6: Ricostituire con 2 ml di metanolo al 15% (equivalente a 2.000 ng/ml).
4. Standard 5: Prelevare 1 ml dello standard 6 e aggiungere 1 ml di metanolo al 15% (equivalente a 1.000 ng/ml).
5. Standard 4: Prelevare 1 ml dello standard 5 e aggiungere 1 ml di metanolo al 15% (equivalente a 500 ng/ml).
6. Standard 3: Prelevare 1 ml dello standard 4 e aggiungere 1 ml di metanolo al 15% (equivalente a 250 ng/ml).
7. Standard 2: Prelevare 1 ml dello standard 3 e aggiungere 1 ml di metanolo al 15% (equivalente a 125 ng/ml).
8. Standard 1: Prelevare 1 ml dello standard 2 e aggiungere 1 ml di metanolo al 15% (equivalente a 62,5 ng/ml).
9. Introdurre 100 µl di ciascuna soluzione nel sistema HPLC.

LC-MS/MS:

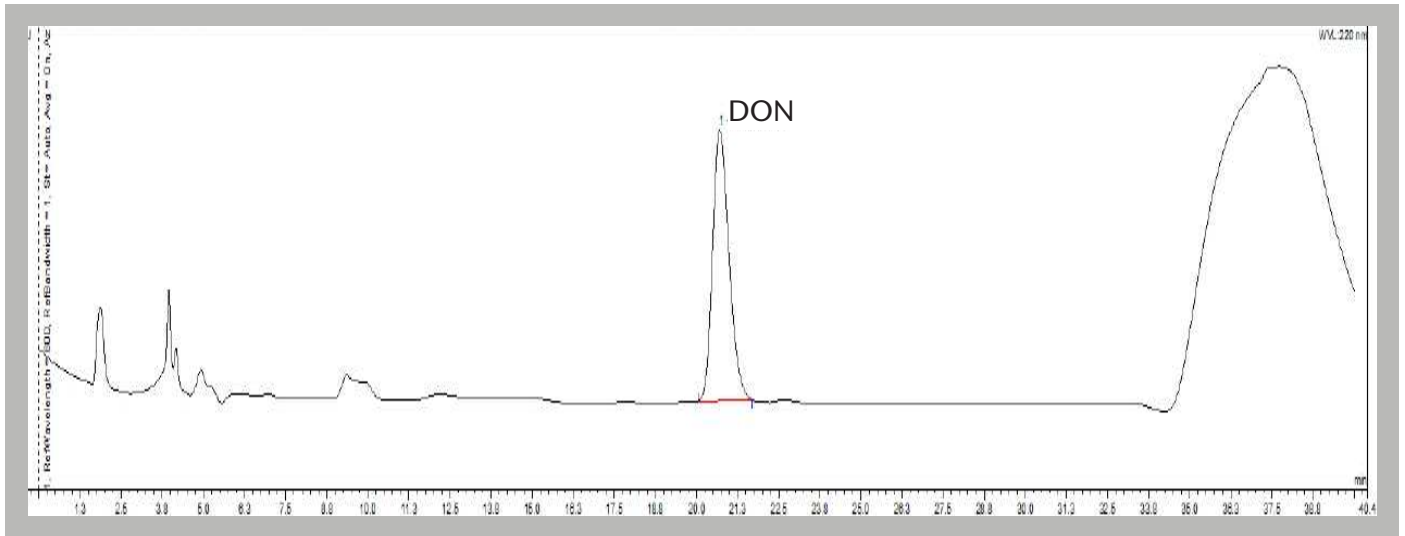
1. Standard 6: Prelevare 10 ml di metanolo al 50% e rimuovere 66,7 µl. Aggiungere 66,7 µl dello standard di deossinivalenolo da 100.000 ng/ml per ottenere una soluzione da 666,7 ng/ml.
2. Standard 5: Prelevare 2 ml dello standard 6 e aggiungere 2 ml di metanolo al 50% (equivalente a 333,3 ng/ml)
3. Standard 4: Prelevare 2 ml dello standard 5 e aggiungere 2 ml di metanolo al 50% (equivalente a 166,7 ng/ml)
4. Standard 3: Prelevare 2 ml dello standard 4 e aggiungere 2 ml di metanolo al 50% (equivalente a 83,3 ng/ml)
5. Standard 2: Prelevare 2 ml dello standard 3 e aggiungere 2 ml di metanolo al 50% (equivalente a 41,7 ng/ml)
6. Standard 1: Prelevare 2 ml dello standard 2 e aggiungere 2 ml di metanolo al 50% (equivalente a 20,8 ng/ml)
7. Introdurre 10 µl di ciascuna soluzione nel sistema LC-MS/MS.

Condizioni raccomandate per l'HPLC

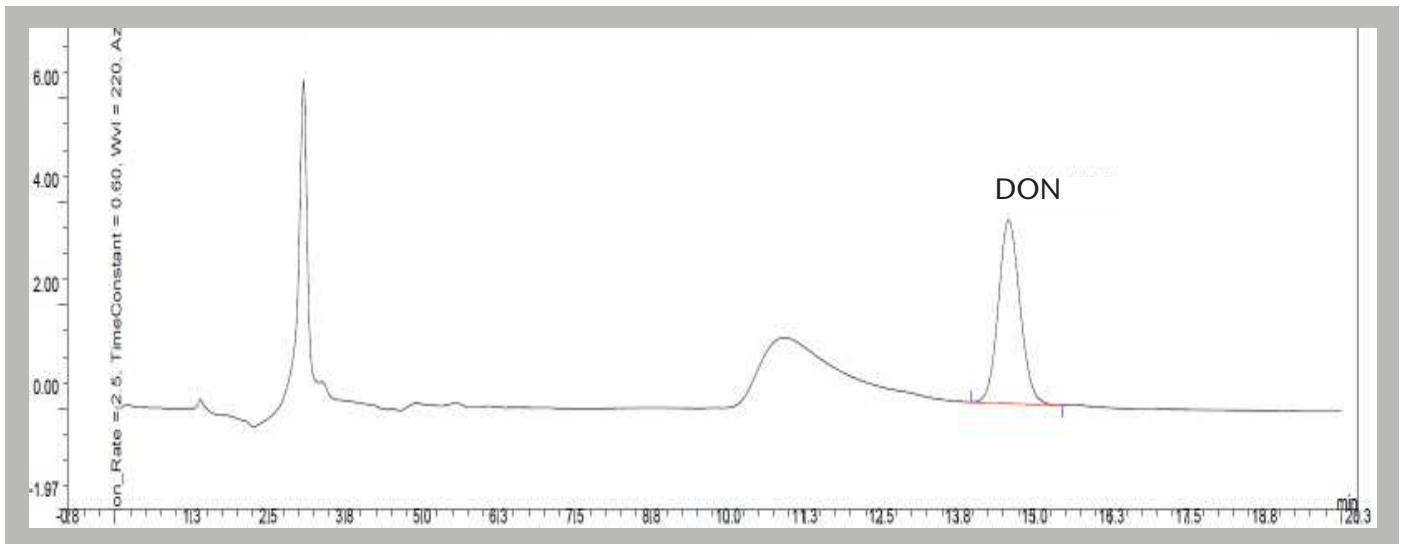
Condizioni per HPLC			
Cartuccia di protezione	AQUASIL C18 3 µm, 4 mm x 10 mm o equivalente		
Colonna analitica	AQUASIL C18 3 µm, 4,6 mm x 150 mm o equivalente		
Fase mobile	Fase mobile A: Acqua Fase mobile B: Metanolo Preparare fresca il giorno dell'analisi		
Condizioni per il gradiente	Tempo (min)	% soluzione A	% soluzione B
	0	85	15
	25	85	15
	26	50	50
	30	50	50
	31	85	15
	40	85	15
Pompa HPLC	Per la fase mobile		
Velocità di flusso	0,4 ml al minuto		
Rilevatore UV	220 nm		
Riscaldatore colonna	Mantenere protezione e colonna analitica a 30 °C		
Integratore / sistema di controllo dei dati	Del fornitore di preferenza		
Iniettore	Autocampionatore / valvola Rheodyne		
Volume di iniezione	100 µl		

Esempi di cromatogrammi HPLC

- Cereali (arricchiti a 1.250 ppb)



- Mangime per animali (arricchito a 5.000 ppb)



Condizioni raccomandate per la LC-MS/MS

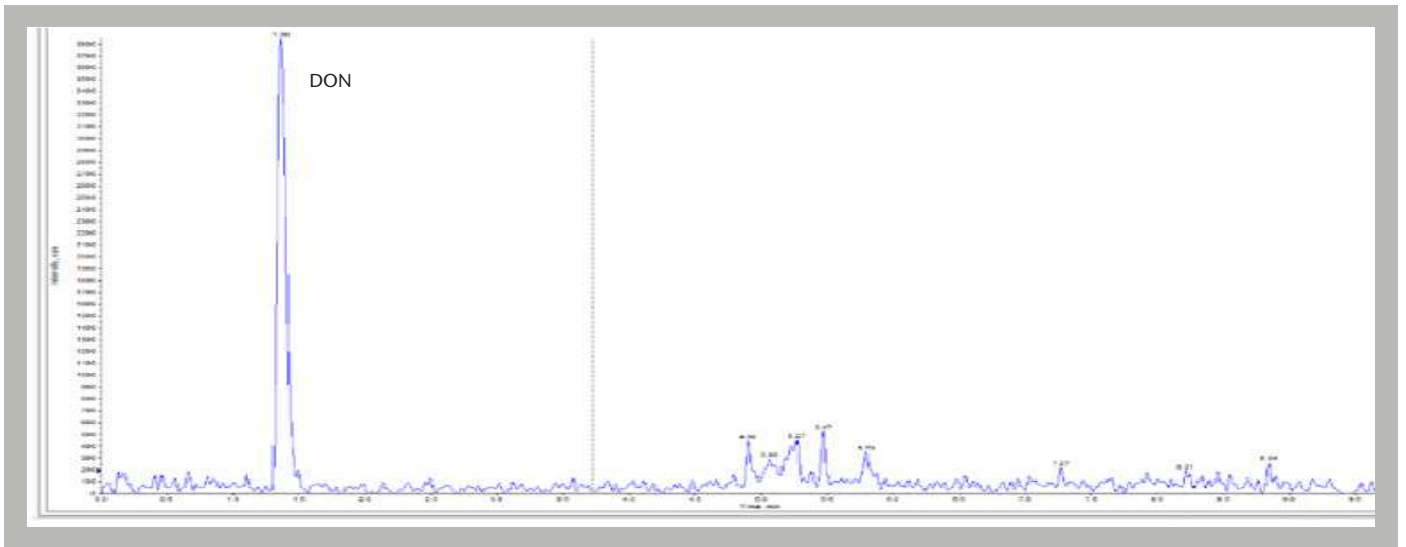
Condizioni della LC-MS/MS			
Colonna analitica	Luna Omega Polar C18, 110 Å, 100 x 3 mm, 3 µm o equivalente		
Fase mobile	Fase mobile A: Formiato di ammonio 1 mM e acido formico allo 0,1% in acqua : metanolo 95 : 5 (v/v) Fase mobile B: Formiato di ammonio 1 mM e acido formico allo 0,1% in acqua : metanolo 2 : 98 (v/v). Preparare fresca il giorno dell'analisi		
Condizioni per il gradiente	Tempo (min)	% soluzione A	% soluzione B
	0	60	40
	0,5	60	40
	4,0	0	100
	6,0	0	100
	6,1	60	40
	10	60	40
Pompa HPLC	Per la fase mobile		
Velocità di flusso	0,6 ml al minuto		
Riscaldatore colonna	Mantenere protezione e colonna analitica a 40 °C		
Integratore / sistema di controllo dei dati	Del fornitore di preferenza		
Volume di iniezione	10 µl		

Condizioni per la spettrometria di massa	
Dispositivo	Sciex QTRAP 5500
Modalità	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Temperatura sorgente	450 °C
Spray ionizzante	3.500 V
Gas sorgente di ioni 1	50 psi
Gas sorgente di ioni 2	55 psi
Gas di cortina	50 psi

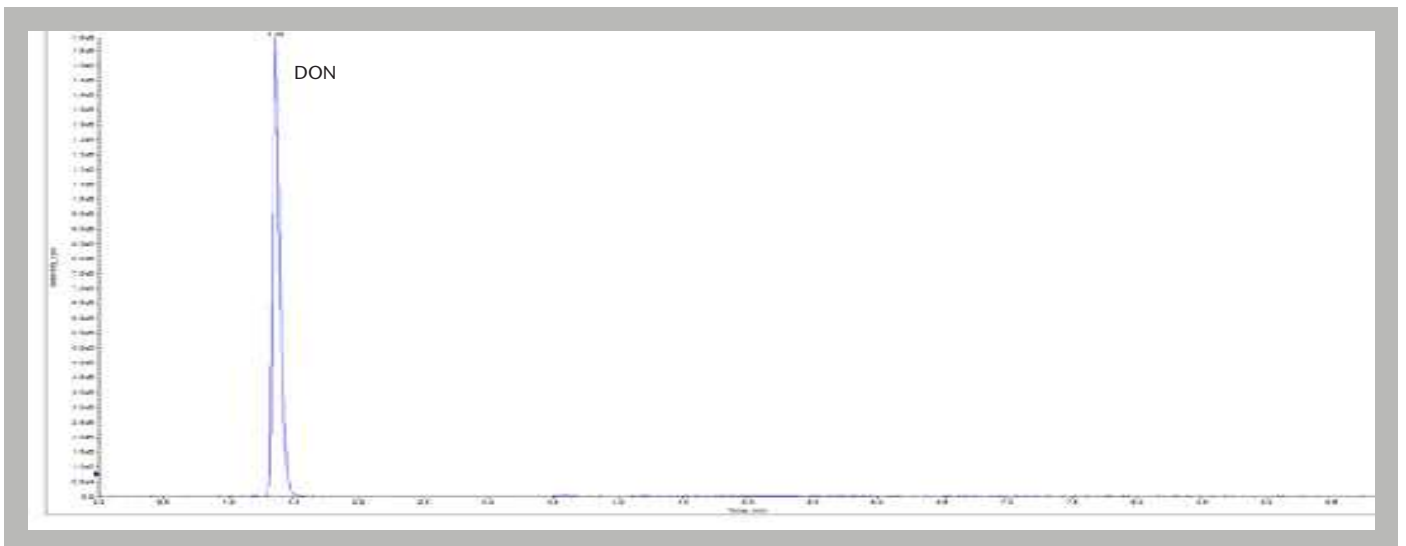
Impostazione del dispositivo						
Tossina	Segmento di tempo (min.)	Ione precursore (m/z)	Ioni prodotto (m/z)	Tempo di permanenza (s)	Energia di collisione (V)	Potenziale di uscita cella (V)
DON	1,36	297,1 [M+H] ⁺	249,00 (quantificatore) 231,00 (qualificatore)	20	15,00 17,00	16,00 15,00

Esempi di cromatogrammi LC-MS/MS

- Cereali (arricchiti a 20 ppb)



- Mangime per animali (arricchito a 5.000 ppb)



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. I riferimenti per i prodotti RBR per i clienti 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.

