

# EASI-EXTRACT<sup>®</sup> VITAMIN B12

Product Code: P80 / P80B

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

P80/V23/04.08.21

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



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**

## Contenuto

	<b>Pag</b>
Principio del Test.....	3
Reagenti Non Forniti .....	3
Prodotti Accessori.....	3
Metodi raccomandati e Note applicative .....	3
Rischi .....	4
Decontaminazione.....	4
Conservazione e Durata .....	4
Campionamento .....	4
Sensibilità.....	4
Recupero .....	5
Preparazione della Colonna .....	5
Inversione del Flusso .....	5
Preparazione della Soluzione A (Contenente TFA allo 0.025 %)	5
Preparazione del tampone di acetato di sodio 50 mM .....	5
Preparazione del Campione .....	6
• Polveri per l'infanzia, alimenti e barrette energetiche.....	6
• Latte .....	7
Preparazione degli standard .....	8
Curva di Calibrazione.....	8
Raccomandazioni per l'HPLC.....	9
Esempio di Cromatogramma in HPLC per alimenti per l'infanzia .....	10
Esempio di Cromatogramma in HPLC per il latte .....	10
Qualità.....	11
Supporto Tecnico.....	11
Garanzia.....	11

## 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 vitamina di interesse. Dopo l'estrazione della vitamina, il campione estratto viene diluito, centrifugato e il surnatante è filtrato prima di farlo passare lentamente attraverso la colonna ad immunoaffinità dove avviene il legame tra l'anticorpo e la vitamina. La colonna viene poi lavata per rimuovere tutto ciò che non si è legato e la vitamina è rilasciata dall'anticorpo in seguito all'aggiunta del solvente. L'eluato viene raccolto prima dell'analisi in HPLC oppure LC-MS/MS.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 2 ore. 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
- Solventi (metanolo e acetonitrile per HPLC)
- Standard di vitamina B12 (si prega di far riferimento alla sezione relativa alla preparazione degli standard)
- Acetato di sodio
- Pepsina\*
- Acido trifluoroacetico (TFA)
- Cianuro di potassio o cianuro di sodio
- Taka-Diastase da *Aspergillus oryzae* ( $\alpha$ -amylase)\*
- Acido acetico

\* Si raccomanda di verificare tutti gli enzimi per il contenuto naturale di vitamina prima dell'analisi poiché potrebbero contenere tracce di vitamina B12.

## Prodotti Accessori

- Carta da filtro Whatman S&S 597½
- 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.

## Metodi raccomandati e Note applicative

Sono disponibili metodi per ulteriori matrici. Eventuali variazioni dei protocolli descritti nel nostro manuale di istruzioni e nelle note applicative non garantiscono risultati ottimali. Per ulteriori informazioni, si prega di contattare il proprio distributore locale.

## Rischi

Cianuro di sodio e cianuro di potassio sono altamente tossici e possono essere corrosivi per il tratto gastrointestinale, la cute, le mucose e gli occhi. Solo laboratori attrezzati per la gestione di materiale e solventi tossici possono eseguire l'analisi. Tutte le fasi di lavoro che coinvolgono cianuro di sodio o cianuro di potassio devono essere eseguite sotto cappa ventilata. Indossare indumenti protettivi come camici, guanti e occhiali protettivi durante l'analisi.

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.

## Decontaminazione

E' necessario lavare e risciacquare accuratamente la vetreria prima dell'uso al fine di evitare cross-contaminazioni.

Prima dello smaltimento, le soluzioni di cianuro di sodio e cianuro di potassio in eccesso devono essere trattate con almeno un decimo del loro volume con ipoclorito di sodio al 5 %. Le attrezzature da laboratorio ed i rifiuti contaminati devono essere immerse in soluzione al 5 % di ipoclorito di sodio per 30 minuti, seguita dall'aggiunta di acetone al 5 % per 30 minuti. Lavare con abbondante acqua prima dello smaltimento. Dopo la decontaminazione le attrezzature da laboratorio dovrebbero essere accuratamente lavate. Incenerire i rifiuti se la normativa lo consente.

## Conservazione e Durata

Le colonne hanno una durata di 18 settimane 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. Tale campione deve essere tritato finemente e una parte di esso (1 - 10 g a seconda del metodo utilizzato) deve essere prelevato ed estratto.

## 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.

Per avere prestazioni ottimali, è necessario tenere in considerazione l' LOQ di un tipico sistema in HPLC, mirando a caricare nella colonna campioni contenenti una quantità di vitamina B12 compresa tra 0.01 - 0.5 µg. Non eccedere oltre a 1.0 µg poiché tale valore è troppo vicino.

## Recupero

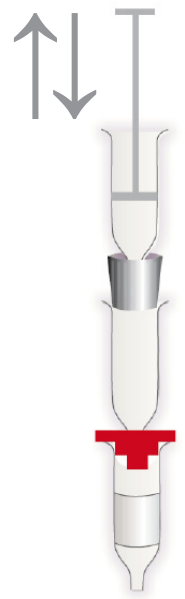
Se un analista desidera tenere in considerazione le perdite che possono avvenire durante l'estrazione, si raccomanda di analizzare un campione arricchito dello stesso tipo di matrice testata seguendo la procedura completa come per uno standard di riferimento. I valori di recupero ottenuti con il campione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

## Preparazione della Colonna

Le colonne di immunoaffinità devono trovarsi a temperatura ambiente prima dell'uso. Togliere il tappo dall'estremità superiore della colonna di immunoaffinità. Fissare saldamente la colonna ad un serbatoio in vetro da siringa mediante adattatore, quindi inserirla nel supporto per colonne o nel supporto a morsetto.

## Inversione del Flusso

Si raccomanda di invertire la direzione del flusso per aumentare il tempo in cui il solvente rimane in contatto con il gel contenente l'anticorpo dentro la sospensione in gel ed assicurare la completa eluizione della tossina. Invertire la direzione del flusso alzando ed abbassando lentamente la siringa durante il passaggio dell'eluente attraverso la colonna. Questa procedura inverte la direzione del flusso dell'eluente e deve essere ripetuta 3 volte.



## Preparazione della Soluzione A (Contenente TFA allo 0.025 %)

La soluzione deve essere preparata lo stesso giorno dell'analisi.

1. Aggiungere 2L di acqua in un idoneo contenitore.
2. Eliminarne 500  $\mu$ l.
3. Aggiungere 500  $\mu$ l di acido trifluoroacetico (TFA).

## Preparazione del tampone di acetato di sodio 50 mM

Il tampone si conserva per 5 giorni a temperatura ambiente.

1. Pesare 4.1 g di aceto di sodio in un apposito contenitore.
2. Aggiungere 950 ml di acqua.
3. Regolare il pH a 4.0 utilizzando acido acetico.
4. Portare ad 1 L con acqua e verificare che il pH sia ancora a 4.0.

## Preparazione del Campione

### • Formule per l'Infanzia, alimento e barrette energetiche

1. A seconda del tipo di matrice da analizzare, pesare la giusta quantità di campione macinato in un provetta di vetro ambrata con tappo a vite.

Matrice	Quantità di campione macinato
Prodotti per l'infanzia ed alimenti (ad esempio cereali, prodotti lattiero-caseari, carne omogeneizzata, miscele di alimenti per l'infanzia)	5 - 30 g
Barrette energetiche	10 g

2. Aggiungere 50 ml di tampone di acetato di sodio 50 mM (pH 4.0).
3. Introdurre il flacone in un agitatore magnetico ed aggiungere 0.5 g di pepsina. Lasciare in agitazione per 10 minuti.
4. Aggiungere 1 ml della soluzione all' 1 % di cianuro di sodio oppure della soluzione all'1 % di cianuro di potassio e lasciare il campione in agitazione per altri 5 minuti.
5. Incubare il campione in un bagnomaria con agitatore a 37 °C per 30 minuti.
6. Trasferire il campione in un altro bagnomaria con agitatore ed incubarlo a 100 °C per 30 minuti. Estrarre il campione dal bagnomaria e farlo raffreddare a temperatura ambiente.
7. Trasferire l'estratto in un flacone tarato in vetro ambrato da 100 ml e portare a questo livello con il tampone di acetato di sodio a 50 mM.
8. Filtrare il surnatante ottenuto con un filtro Whatman S&S 597½.
9. A seconda del tipo di matrice, far passare un adeguato volume di filtrato attraverso la colonna secondo la tabella seguente. Far passare il filtrato attraverso la colonna ad una velocità di flusso di 2 ml per minuto (in alternativa il campione può essere fatto passare attraverso la colonna per gravità). E' essenziale mantenere un flusso lento e costante per la cattura della vitamina da parte degli anticorpi.

Matrice	Volume di filtrato
Prodotti per l'infanzia	5 - 10 ml
Alimenti (ad esempio cereali, prodotti lattiero-caseari, carne omogeneizzata, miscele di alimenti per l'infanzia)	15 - 30 ml
Barrette energetiche	20 - 25 ml

10. Lavare la colonna facendo passare 10 ml di acqua attraverso con un flusso di circa 5 ml per minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni liquido residuo.
11. Eluire la vitamina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 3 ml di metanolo al 100 % e raccoglierla in una provetta in vetro. Si raccomanda di invertire il flusso. Per maggiori informazioni, si prega di far riferimento al paragrafo corrispondente.
12. Evaporare l'eluato mediante aria a secco a 60 - 70 °C.
13. Ricostituire con 300 µl della soluzione A. Miscelare mediante vortex per 20 secondi.
14. Introdurre 100 µl in un sistema HPLC.

## Preparazione del campione

### • Latte

1. Introdurre 30 ml di campione in un flacone di vetro ambrato con tappo a vite.
2. Aggiungere 50 ml di tampone di acetato di sodio 50 mM (pH 4.0).
3. Introdurre il flacone in un agitatore magnetico ed aggiungere 0.25g di  $\alpha$ -amilasi e 1 g di pepsina. Lasciare in agitazione per 10 minuti.
4. Aggiungere 1 ml della soluzione all' 1 % di cianuro di sodio oppure della soluzione all'1 % di cianuro di potassio e lasciare il campione in agitazione per altri 5 minuti.
5. Incubare il campione in un bagnomaria con agitatore a 37 °C per 30 minuti.
6. Trasferire il campione in un altro bagnomaria con agitatore ed incubarlo a 100 °C per 30 minuti. Estrarre il campione dal bagnomaria e farlo raffreddare a temperatura ambiente.
7. Trasferire l'estratto in un flacone tarato in vetro ambrato da 100 ml e portare a questo livello con il tampone di acetato di sodio a 50 mM.
8. Filtrare il surnatante ottenuto con un filtro Whatman S&S 597½.
9. A seconda del tipo di matrice, far passare un adeguato volume di filtrato attraverso la colonna secondo la tabella seguente. Far passare il filtrato attraverso la colonna ad una velocità di flusso di 2 ml per minuto (in alternativa il campione può essere fatto passare attraverso la colonna per gravità). E' essenziale mantenere un flusso lento e costante per la cattura della vitamina da parte degli anticorpi.

Matrice	Volume del filtrato
Latte vaccino, latte di soia	10 ml
Latte UHT a lunga conservazione	20 ml

10. Lavare la colonna facendo passare 10 ml di acqua attraverso con un flusso di circa 5 ml per minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni liquido residuo.
11. Eluire la vitamina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 3 ml di metanolo al 100 % e raccoglierla in una provetta in vetro. Si raccomanda di invertire il flusso. Per maggiori informazioni, si prega di far riferimento al paragrafo corrispondente.
12. Evaporare l'eluato mediante aria a secco a 60 - 70 °C.
13. Ricostituire con 300  $\mu$ l della soluzione A. Miscelare mediante vortex per 20 secondi.
14. Introdurre 100  $\mu$ l in un sistema HPLC.

## Preparazione degli Standard

E' possibile acquistare cianocobalamina in polvere. La polvere deve essere sciolta per ottenere una concentrazione di 1.000 µg/ml . Lasciar riposare per tutta la notte a 2 - 8 ° C per ottenere la soluzione madre. Tutti gli standard devono essere preparati in flaconi di vetro ambrati.

## 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.

Esempio di come preparare una curva di calibrazione a quattro punti (si possono apportare variazioni in base al contenuto di vitamina atteso):

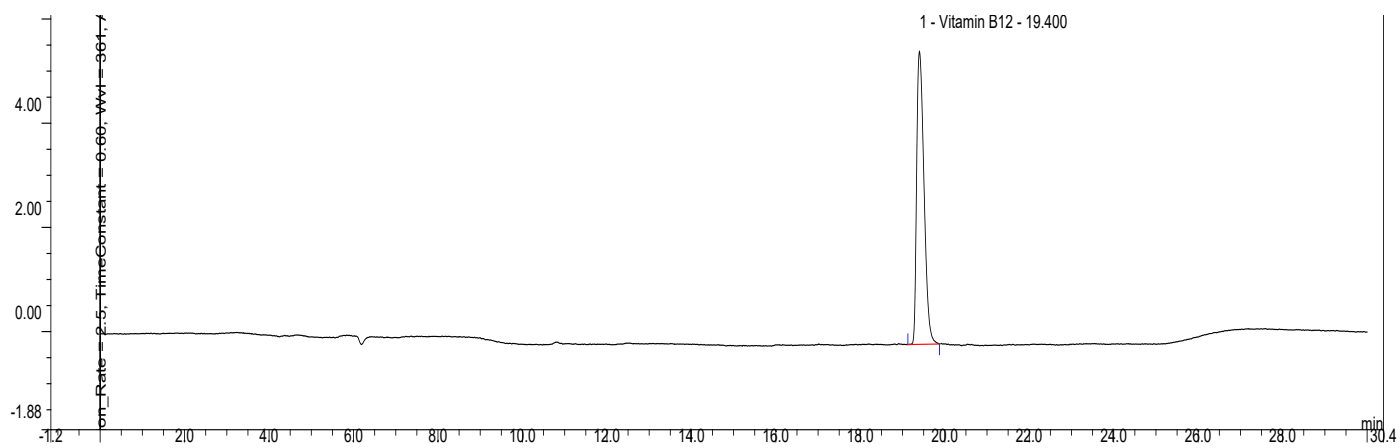
1. Prelevare 100 ml di acqua ed eliminarne 1 ml.
2. Aggiungere 1 ml dello standard di cianocobalamina da 1 mg/ml per ottenere una soluzione di cianocobalamina da 10 µg/ml.
3. Standard 4: Prelevare 8 ml di soluzione A ed eliminarne 120 µl. Aggiungere 120 µl della soluzione da 10 µg/ml (equivalente a 0.15 µg/ml)
4. Standard 3: Prelevare 1 ml della soluzione da 0.15 µg/ml ed aggiungere 1 ml di soluzione A (equivalente a 0.075 µg/ml).
5. Standard 2: Prelevare 1 ml della soluzione da 0.075 µg/ml ed aggiungere 1 ml di soluzione A (equivalente a 0.0375 µg/ml).
6. Standard 1: Prelevare 1 ml della soluzione da 0.0375 µg/ml ed aggiungere 1 ml di soluzione A (equivalente a 0.01875 µg/ml).
7. Iniettare 100 µl di ciascuna soluzione nell'HPLC.



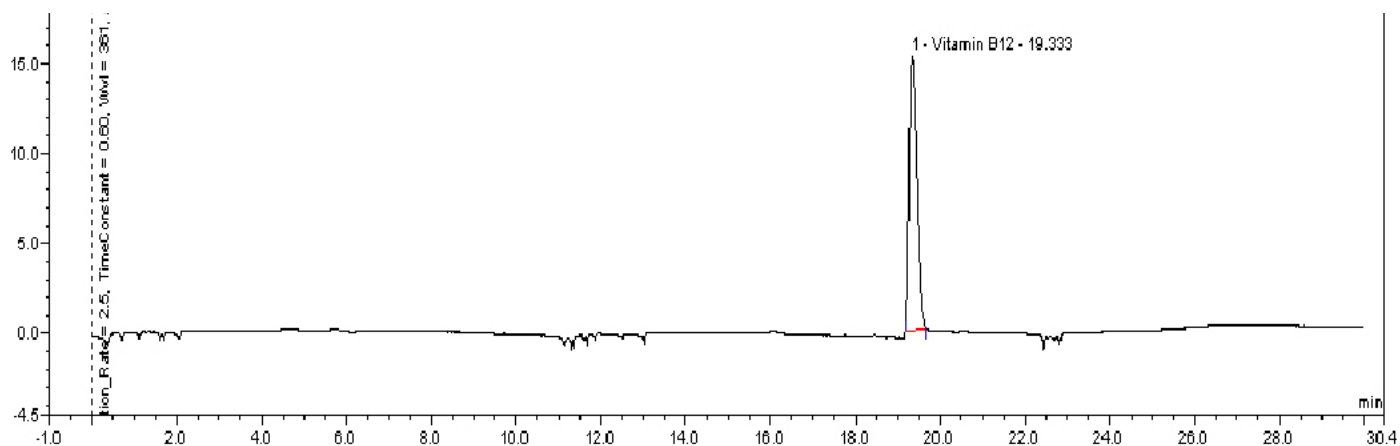
## Raccomandazioni per l'HPLC

HPLC Conditions			
Guard Cartridge	ACE 3 AQ 3 µm, 4 mm x 10 mm or equivalent		
Analytical Column	C18 ACE 3 AQ 3 µm, 3 mm x 150 mm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: 0.025 % TFA in Water (pH 2.6) Solution B: Acetonitrile Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time	% Solution A	% Solution B
	0	100	0
	0.5	100	0
	11	85	15
	19	75	25
	20	90	10
	26	100	0
	30	100	0
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.25 ml per minute		
UV Detector	361 nm		
Column Heater	Maintain guard and analytical column at 30 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	100 µl		

## Esempio di Cromatogramma in HPLC per miscele per l'infanzia



## Esempio di Cromatogramma in HPLC per latte vaccino



## 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.

**R-Biopharm Rhône Ltd**  
Block 10 Todd Campus  
West of Scotland Science Park  
Acre Road, Glasgow G20 0XA  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)