

AFLAOCHRA PREP[®]

Codice prodotto: P89 / P89B

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

P89/V15/27.05.22

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 | 5 |
| Decontaminazione | 5 |
| Conservazione e durata | 5 |
| Campionamento | 5 |
| Sensibilità | 5 |
| Recuperi | 5 |
| Preparazione delle colonne | 5 |
| Eluizione | 6 |
| Preparazione dei campioni | 7 |
| • Cereali | 7 |
| • Spezie e frutta essicata | 8 |
| Preparazione degli standard | 9 |
| Curva di calibrazione | 9 |
| Condizioni raccomandate per l'HPLC | 10 |
| Esempi di cromatogrammi HPLC | 11 |
| • Mais | 11 |
| • Paprica | 11 |
| Condizioni raccomandate per la LC-MS/MS | 12 |
| Esempi di cromatogrammi LC-MS/MS | 13 |
| • Mais | 13 |
| • Paprica | 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 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 e iniettato prima dell'analisi mediante HPLC o LC-MS/MS. Quando sono analizzate mediante HPLC, le aflatossine devono essere derivatizzate.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 20 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

- Acqua distillata / deionizzata (adatta per l'uso con HPLC, ad es. MilliQ)
- Solventi (metanolo per HPLC)
- Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) (RP202)*
- Standard di micotossine (fare riferimento alla sezione Preparazione degli standard)
- Cloruro di sodio
- Idrossido di sodio (pH filtrato se richiesto)
- Acido nitrico (richiesto solo durante la derivatizzazione con KOBRA® CELL)
- Bromuro di potassio (richiesto solo durante la derivatizzazione con KOBRA® CELL)

Prodotti accessori

- Carta da filtro Whatman N. 113 o N. 4
- Carta da filtro in microfibra di vetro
- KOBRA® CELL (K01)*
- 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 e pseudo-cereali, fra cui grano, orzo, mais, quinoa, miglio, farro e bulgur.

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. 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. Diluire 4 ml del filtrato con 36 ml di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).
5. Filtrare l'estratto diluito attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
6. **HPLC:** Far passare 10 ml del filtrato (equivalente a 0,25 g di campione).
LC-MS/MS: Far passare 20 ml del filtrato diluito (equivalente a 0,5 g di campione).
Il filtrato deve passare 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 20 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 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 ml di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa fiala per un volume totale di 2 ml.
10. **HPLC:** Introdurre 100 µl nel sistema HPLC.
LC-MS/MS: Introdurre 25 µl nel sistema per LC-MS/MS.

Preparazione dei campioni

• Spezie e frutta essiccata

Questo metodo è stato verificato su numerose spezie fra cui paprica e pepe nero e frutta essiccata di vario genere fra cui uva sultanina, uva passa, fichi e albicocche.

Nota: è disponibile una nota applicativa specifica per estratto di paprica e curcuma.

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. 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. Diluire 4 ml del filtrato con 36 ml di Tween 20 al 10% in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).
5. Regolare il pH a circa 7,4 con idrossido di sodio 2 M.
6. Filtrare l'estratto diluito attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
7. Far passare 10 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 le tossine è essenziale una velocità di flusso lenta e costante.
8. **HPLC:** Lavare la colonna con 20 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 aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
9. Eluire le tossine dalla 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. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
10. Dopo l'eluizione far passare 1 ml di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa fiala per un volume totale di 2 ml.
11. **HPLC:** Introdurre 100 µl nel sistema HPLC.
LC-MS/MS: Introdurre 25 µl nel sistema per 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. Notare il rapporto corretto per lo standard acquistato.

• Soluzione stock di ocratossina

È consigliabile iniziare con una soluzione di ocratossina A da 1.000 ng/ml.

• Standard di lavoro combinato

1. Misurare 2,5 ml di metanolo al 100% in una fiala ambrata.
2. Rimuovere 160 µl e scartarli.
3. Aggiungere 100 µl di standard di aflatossine totali da 1.000 ng/ml e 60 µl di standard di ocratossina da 1.000 ng/ml.
4. Aggiungere 2,5 ml di acqua per ottenere una soluzione combinata da 20 ng/ml di aflatossine totali e 12 ng/ml di ocratossina.

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 quattro punti (è possibile apportare variazioni in base ai requisiti normativi o ai livelli di contaminazione):

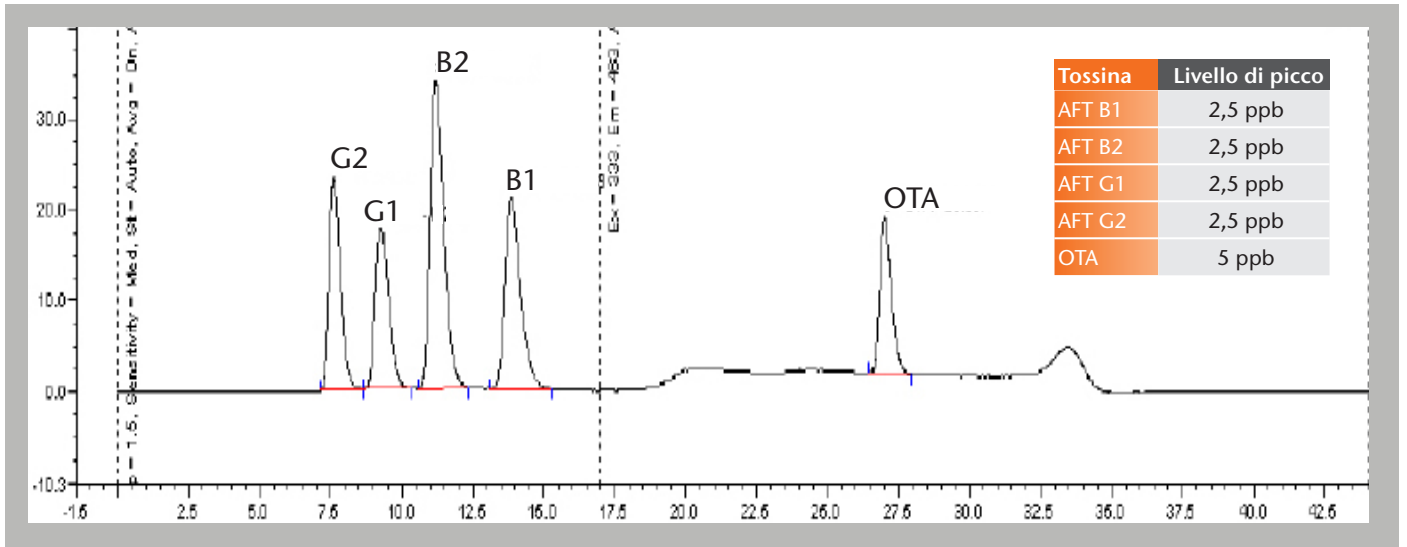
1. Standard 4: Prelevare 250 µl dello standard di lavoro combinato e riempire fino a 2 ml con metanolo al 50% (equivalente a 2,5 ng/ml di aflatossine totali e 1,5 ng/ml di ocratossina A).
2. Standard 3: Prelevare 1 ml dello standard 4 e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 1,25 ng/ml di aflatossine totali e 0,75 ng/ml di ocratossina A).
3. Standard 2: Prelevare 1 ml dello standard 3 e aggiungere 1 ml di metanolo al 50% (equivalente a 0,625 ng/ml di aflatossine totali e 0,375 ng/ml di ocratossina A).
4. Standard 1: Prelevare 800 µl dello standard 2 e riempire fino a 2 ml con metanolo al 50% (equivalente a 0,25 ng/ml di aflatossine totali e 0,15 ng/ml di ocratossina A).
5. **HPLC:** Introdurre 100 µl di ciascuna soluzione nel sistema HPLC. L'ordine di eluzione per le aflatossine totali è G2, G1, B2, B1 e ocratossina A in caso di derivatizzazione con KOBRA® CELL.
LC-MS/MS: Introdurre 25 µl di ciascuna soluzione nel sistema per LC-MS/MS.

Condizioni raccomandate per l'HPLC

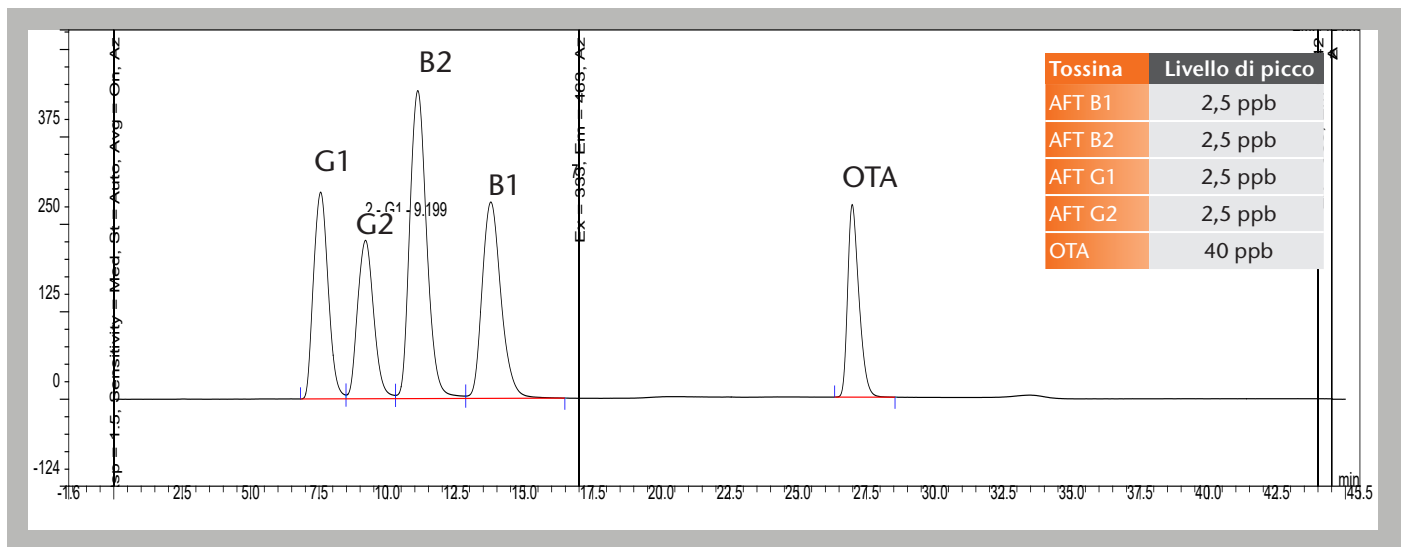
| Condizioni per HPLC | | | |
|---|---|------------------|----------------|
| Derivatizzazione | Impostazione di KOBRA® CELL a 100 µA | | |
| Cartuccia di protezione | Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm (Hichrom) o equivalente | | |
| Colonna analitica | Inertsil ODS-3V 5 µm, 4,6 mm x 150 mm (Hichrom) o equivalente | | |
| Fase mobile | Fase mobile A: Acqua : metanolo (55 : 45 v/v) Fase mobile B: Acqua : metanolo (20 : 80 v/v) Aggiungere 119 mg di bromuro di potassio e 350 µl di acido nitrico 4 M a 1 litro di fase mobile A e B. Preparare fresca il giorno dell'analisi. | | |
| Condizioni per il gradiente | Tempo (min) | % soluzione A | % soluzione B |
| | 0 | 100 | 0 |
| | 14 | 100 | 0 |
| | 16 | 35 | 65 |
| | 30 | 35 | 65 |
| | 31 | 100 | 0 |
| | 40 | 100 | 0 |
| Pompa HPLC | Del fornitore di preferenza | | |
| Velocità di flusso | 0,8 ml al minuto | | |
| Rilevatore a fluorescenza | Tempo (min) | Eccitazione (nm) | Emissione (nm) |
| | 0 | 365 | 442 |
| | 17 | 333 | 463 |
| 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 | | |
| Ordine di eluizione | G2, G1, B2, B1, ocratossina A | | |

Esempi di cromatogrammi HPLC

- Mais**



- Paprica**



Condizioni raccomandate per la LC-MS/MS

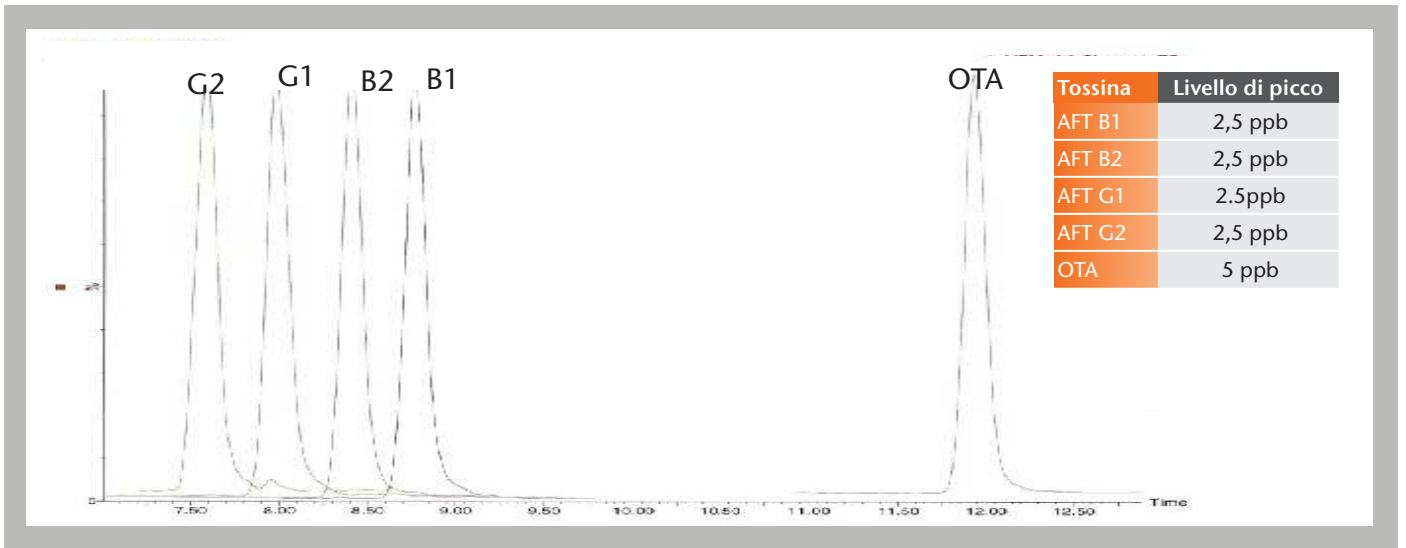
| Condizioni per LC | | | |
|---|--|---------------|---------------|
| Colonna analitica | Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 A, 150 mm x 3 mm o equivalente | | |
| Fase mobile | Fase mobile A: Formiato di ammonio 1 mM e acido formico allo 0,1% in acqua : metanolo (95 : 5 v/v) Fase mobile B: Formiato di 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 | 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 | +0,64 KV |
| Temperatura sorgente | 150 °C |
| Temperatura gas di desolvatazione | 350 °C |
| Flusso del gas di desolvatazione | 800 l/ora (N) |
| Flusso del gas del cono | 50 l/ora (N) |

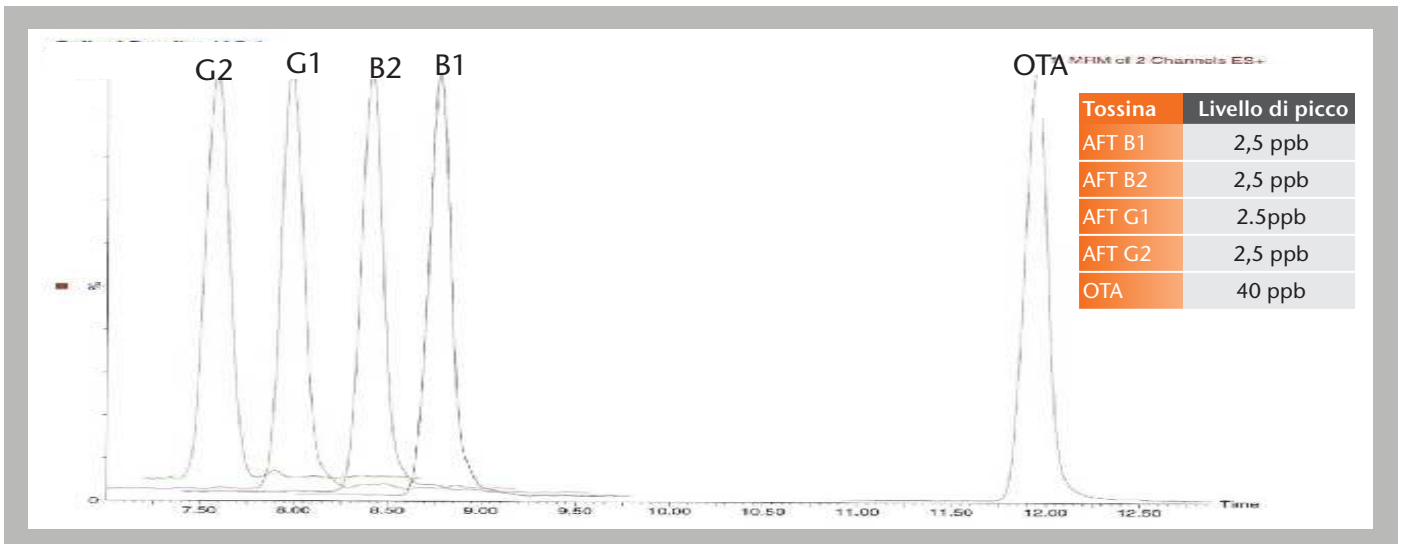
| Impostazione del dispositivo | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|---|-------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Tossina | Segmento di tempo (min.) | Ione precursore (m/z) | Ioni prodotto (m/z) | Tempo di permanenza (s) | Tensione cono (V) | Tensione di collisione (eV) |
| AFT G2 | 7,81 | 330,9 [M+H] ⁺ | 245,13 (quantificatore) 189,07 (qualificatore) | 0,102 | 54 54 | 32 42 |
| AFT G1 | 8,21 | 328,9 [M+H] ⁺ | 243,06 (quantificatore) 199,88 (qualificatore) | 0,102 | 52 52 | 28 42 |
| AFT B2 | 8,66 | 314,9 [M+H] ⁺ | 281,12 (quantificatore) 259,15 (qualificatore) | 0,102 | 58 58 | 26 30 |
| AFT B1 | 9,02 | 312,9 [M+H] ⁺ | 284,93 (quantificatore) 241,10 (qualificatore) | 0,102 | 50 50 | 22 36 |
| OTA | 12,03 | 403,9 [M+H] ⁺ | 239,0 (quantificatore) 358,1 (qualificatore) | 0,428 | 32 32 | 22 14 |

Esempi di cromatogrammi LC-MS/MS

- Mais



- Paprica



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.

