

AOF MS-PREP[®]

Cod Prodotto: P115 / P115B

Colonne ad immunoaffinità da utilizzare in associazione alla LC-MS/MS.
Solo per uso *in vitro*.

P115/V5/17.01.20

www.r-biopharm.com



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Contenuto

	Pag
Principio del Test.....	4
Reagenti Non Forniti	4
Prodotti Accessori.....	4
Rischi	5
Metodi raccomandati e note applicative.....	5
Decontaminazione.....	5
Conservazione e Durata	5
Campionamento	5
Sensibilità.....	5
Recupero	6
Preparazione della Colonna	6
Eluizione	6
Preparazione del campione	7
• Cereali.....	7
• Mangimi.....	8
Preparazione degli Standard.....	9
• Preparazione della soluzione standard di Aflatossine totali.....	9
• Preparazione della soluzione standard di Ocratossina.....	9
• Preparazione della soluzione standard di Fumonisine	9
Curva di calibrazione	10
Condizioni raccomandate per LC	10
Esempio di cromatogramma LC-MS/MS Total Ion Count per mais	12
Esempio di cromatogramma LC-MS/MS Total Ion Count per mangimi.....	13
Qualità.....	14
Supporto Tecnico.....	14
Garanzia.....	14

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 tossina di interesse. Dopo l'estrazione della tossina, il campione estratto viene filtrato, diluito e fatto passare lentamente attraverso la colonna ad immunoaffinità. L'eventuale tossina presente nel campione è trattenuta dall'anticorpo all'interno della sospensione in gel. La colonna viene poi lavata per rimuovere tutto ciò che non si è legato e la tossina è rilasciata dall'anticorpo in seguito all'eluizione con un idoneo solvente. L'eluato viene raccolto, lasciato evaporare e ricostituito prima dell'analisi in LC-MS/MS.

Il tempo totale necessario per l'estrazione e la purificazione è di circa 30 minuti. 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 (adatto per l'uso con HPLC, ad esempio MilliQ)
- Solventi (metanolo e acetonitrile per HPLC)
- Pastiglie PBS (RP202)*
- Standard di micotossine (Si prega di fare riferimento alla sezione dedicata alla preparazione degli standard)
- Ammonio formiato
- Acido formico
- Acido acetico
- Cloruro di sodio
- Idrossido di sodio (a pH filtrato se richiesto)

Prodotti Accessori

- Carta da filtro Whatman No. 113 oppure No. 4
- Carta da filtro con microfibre in vetro
- 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 distributore locale R-Biopharm.

Rischi

Le micotossine sono sostanze molto pericolose. Solo laboratori attrezzati possono eseguire questo tipo di analisi, durante le quali è necessario indossare indumenti protettivi come camici, guanti e occhiali protettivi.

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.

Metodi raccomandati e note applicative

I metodi sono disponibili per tutte le matrici a norma di legge, oltre che per altri prodotti. Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm.

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 18 mesi 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 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 (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 aumentando il volume del campione che viene fatto passare attraverso la colonna ad immunoaffinità.

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 ad immunoaffinità devono trovarsi a temperatura ambiente prima dell'uso.

È normale che ci sia dello spazio tra il gel ed il setto poroso. Talvolta, durante il trasporto, si può formare una bolla in questo spazio. In questi casi, per rimuovere la bolla, basta semplicemente picchiettare la base della colonna su una superficie rigida.

Rimuovere il cappuccio dalla parte superiore della colonna ed eliminarlo. Fissare saldamente la colonna ad un serbatoio in vetro da siringa mediante adattatore, quindi inserirla nel supporto per colonne o nel 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 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: -

Backflush (metodo preferito da R-Biopharm): backflush 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 del campione

• Cereali

1. Pesare 25 g di campione tritato e 5 g di cloruro di sodio in un contenitore per miscelatore resistente ai solventi dalla capacità di 1 litro
2. Aggiungere 100 ml di metanolo al 60% e mescolare ad alta velocità per 2 minuti
3. Filtrare il campione utilizzando carta da filtro Whatman N. 113 oppure N. 4. In alternativa centrifugare a 4000 rpm per 10 minuti
4. Diluire 10 ml del filtrato con 15 ml di PBS
5. Filtrare l'estratto diluito utilizzando carta da filtro con microfibre in vetro.
6. Far passare 5 ml del filtrato (equivalente a 0.5 g di campione) attraverso la colonna con un flusso di 2 ml al minuto (in alternativa è possibile far passare la soluzione attraverso la colonna per gravità). Per la "cattura" della tossina da parte dell'anticorpo è essenziale applicare una pressione lenta e costante
7. Lavare la colonna facendo passare 20 ml di PBS con un flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
8. Eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1 ml di metanolo al 100 % e raccoglierlo in una provetta di vetro da 5 ml. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. A seguito della eluizione, far passare 1 ml di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa provetta per avere un volume finale di 2 ml.
10. Iniettare 50 µl nel sistema LC-MS/MS system

Preparazione del campione

• Mangimi

1. Pesare 25 g di campione tritato in un contenitore per miscelatore resistente ai solventi dalla capacità di 1 litro.
2. Aggiungere 100 ml di acetonitrile: acido acetico: acqua (74:1:25 v/v/v) e mescolare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione utilizzando carta da filtro Whatman N. 113 oppure N. 4. In alternativa centrifugare a 4000 rpm per 10 minuti.
4. Diluire 5 ml del filtrato con 75 ml di PBS.
5. Regolare il pH a 7.4 utilizzando idrossido di sodio 2 M.
6. Filtrare l'estratto diluito attraverso la carta da filtro in microfibra di vetro.
7. Far passare 32 ml del filtrato (equivalente a 0.5 g di campione) attraverso la colonna con un flusso di 2 ml al minuto (in alternativa è possibile far passare la soluzione attraverso la colonna per gravità). Per la "cattura" della tossina da parte dell'anticorpo è essenziale applicare una pressione lenta e costante.
8. Lavare la colonna facendo passare 20 ml di PBS con un flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
9. Eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1 ml di metanolo al 100 % e raccoglierlo in una provetta di vetro ambrata. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
10. A seguito della eluizione, far passare 1 ml di acqua attraverso la colonna e raccoglierla nella stessa provetta per avere un volume finale di 2 ml.
11. Iniettare 25 μ l nel sistema LC-MS/MS.

Preparazione degli Standard

• Preparazione dello Standard di Aflatossine Totali

Preparazione di una soluzione stock di aflatossina B1, B2, G1 e G2 da 1000 ng/ml.

1. Presso R-Biopharm è disponibile lo standard pronto all'uso AFLASTANDARD (P22/P22A da 1000 ng/ml).

oppure

1. In alternativa è possibile acquistare aflatossina B1,B2, G1 e G2 cristallina in polvere. Per maggiori informazioni potete contattare il distributore locale R-Biopharm. La polvere deve essere ricostituita seguendo le istruzioni fornite e lasciata per tutta la notte a temperatura ambiente e al buio per ottenere una soluzione stock.
2. Questa deve poi essere utilizzata per preparare una soluzione standard di aflatossina B1, B2, G1 e G2 da 1000 ng/ml.

Nota: Si prega di notare che il rapporto tra B1,B2, G1 e G2 può variare in ciascuno standard. E' necessario fare riferimento al corretto rapporto dello standard acquistato.

• Preparazione della soluzione stock di Ocratossina

Preparazione di una soluzione stock di ocratossina A da 1000 ng/ml.

1. Presso R-Biopharm è disponibile lo standard pronto all'uso OCHRASTANDARD (P11/P11A da 1000 ng/ml).

oppure

1. In alternativa è possibile acquistare ocratossina A cristallina in polvere. Per maggiori informazioni potete contattare il distributore locale R-Biopharm. La polvere deve essere ricostituita seguendo le istruzioni fornite e lasciata per tutta la notte a temperatura ambiente e al buio per ottenere una soluzione stock.
2. Questa deve poi essere utilizzata per preparare una soluzione standard di ocratossina A da 1000 ng/ml.

• Preparazione della soluzione stock di Fumonisinina

Preparazione della soluzione di stock da 150.000 ng/ml di fumonisinina:

1. E' possibile acquistare fumonisinina cristallina in polvere. Per maggiori informazioni potete contattare il distributore locale R-Biopharm. La polvere deve essere ricostituita seguendo le istruzioni fornite e lasciata per tutta la notte a temperatura ambiente e al buio per ottenere una soluzione stock.
2. Questa deve poi essere utilizzata per preparare una soluzione standard di fumonisinina da 150.000 ng/ml.

Nota: Si prega di notare che il rapporto tra FB1 e FB2 può variare in ciascuno standard. E' necessario fare riferimento al corretto rapporto dello standard acquistato.

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 realizzazione di una curva di calibrazione a tre punti (può essere modificata secondo i requisiti legislativi oppure i livelli di contaminazione):

- Standard 5:
 - Prelevare 5 ml di metanolo al 100 % e rimuovere 200 µl da scartare.
 - Aggiungere 100 µl dello standard di aflatoxine totali da 1000 ng/ml, 50µl dello standard di ocratossina A da 1000 ng/ml e 100 µl di standard di fumonisina da 150.000 ng/ml.
 - Aggiungere 4.95 ml di acqua /equivalente a 10 ng/ml di aflatoxine totali, 5 ng/ml di ocratossina A e 1500 ng/ml di fumonisina).
- Standard 4: Prelevare 5 ml dello standard 5 ed aggiungere 5 ml di metanolo al 50 % (equivalente a 4 ng/ml di aflatoxina, 2.5 ng/ml di ocratossina A e 750 ng/ml di fumonisina).
- Standard 3: Prelevare 4 ml dello standard 4 ed aggiungere 6 ml di metanolo al 50 % (equivalente a 2 ng/ml di aflatoxina, 1 ng/ml di ocratossina A e 300 ng/ml di fumonisina).
- Standard 2: Prelevare 5 ml dello standard 3 ed aggiungere 5 ml di metanolo al 50 % (equivalente a 1 ng/ml di aflatoxina, 0.5 ng/ml di ocratossina A e 150 ng/ml di fumonisina).
- Standard 1: Prelevare 5 ml dello standard 2 ed aggiungere 5 ml di metanolo al 50 % (equivalente a 0.5 ng/ml di aflatoxina, 0.25 ng/ml di ocratossina A e 75 ng/ml di fumonisina).
- Iniettare 50 µl di ciascuna soluzione nel sistema LC-MS/MS.

Condizioni raccomandate per LC

LC Conditions			
Guard Cartridge	Phenomenex Gemini C18 4 mm x 2 mm or equivalent		
Analytical Column	Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 A, 150 mm x 3 mm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: Deionised Water : Methanol : Formic Acid (95 : 5 : 0.1 v/v/v) containing 1 mM Ammonium Formate Solution B: Deionised Water : Methanol : Formic Acid (2 : 98 : 0.1 v/v/v) containing 1 mM Ammonium Formate Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	80	20
	0.1	80	20
	10	10	90
	15	10	90
	15.1	80	20
	25	80	20
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.3 ml per minute		
Column Heater	Maintain guard and analytical columns at 40 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	50 µl or 25 µl		

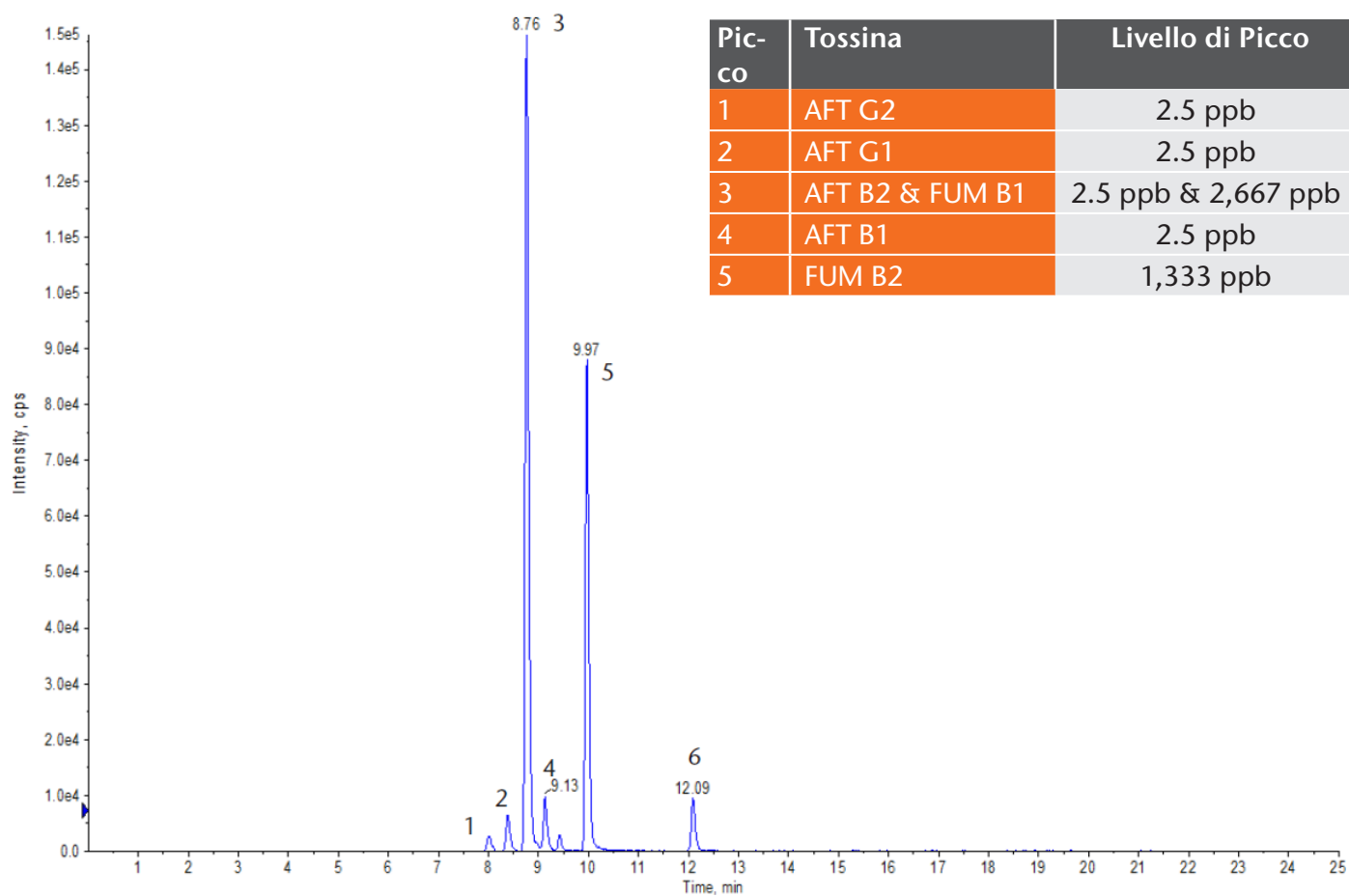
Mass Spectrometry Conditions

Instrument	Applied Biosystems API3000 LC-MS/MS with TurbolonSpray®
Mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM) Mode with positive polarity
TurboProbe Temperature	450 °C
TurboProbe Heater Gas (Gas 2)	8 L/min (set manually)
IonSpray Voltage	+3,500 V
IonSpray Nebuliser Gas (Gas 1)	12
Curtain Gas	8
Collision Gas	12

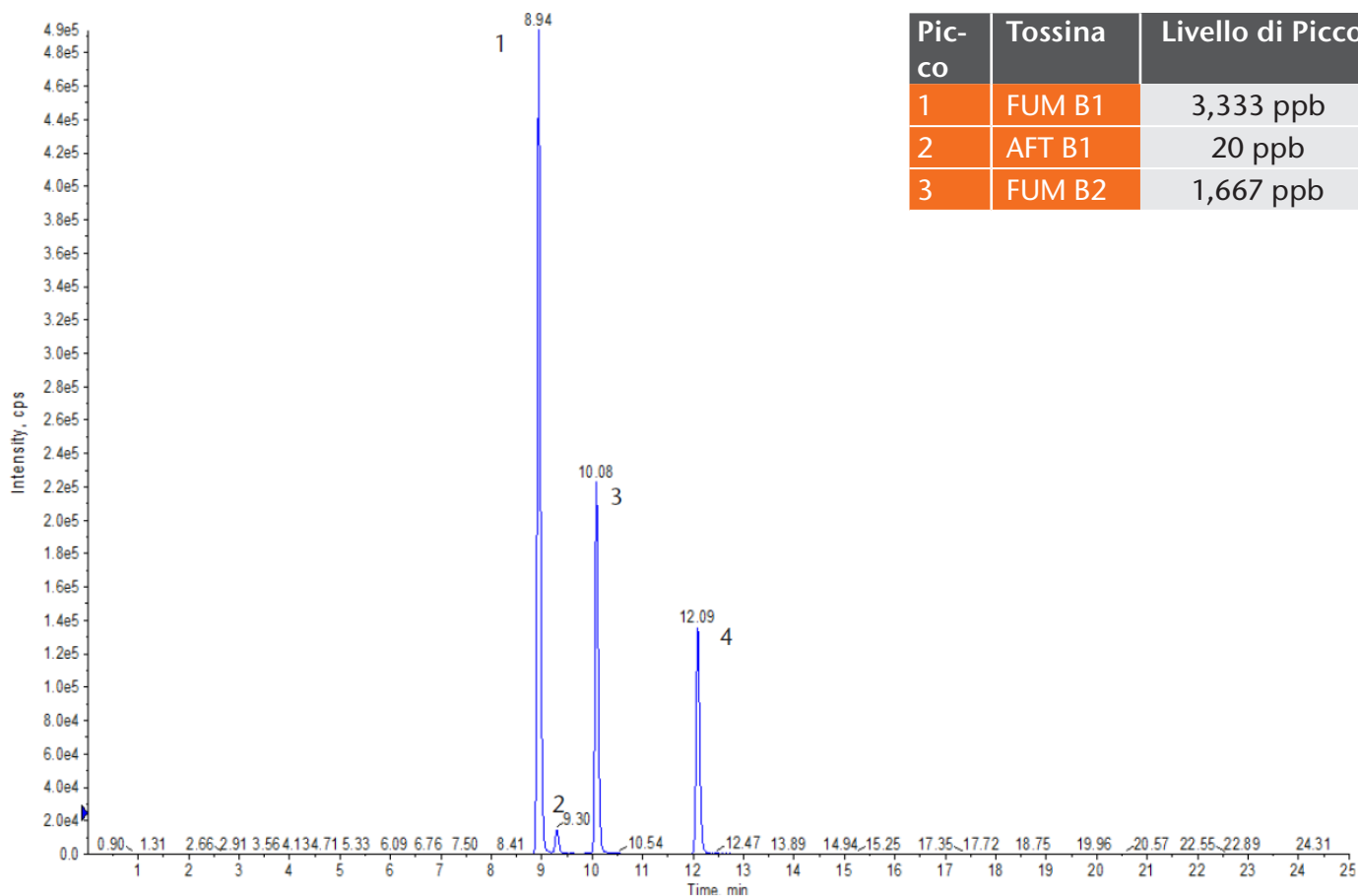
Instrument Setting

Toxin	Q1 Precursor Ion (m/z)	Q3 Product Ion (m/z)	Dwell Time (ms)		Focusing Potential (V)		Collision Exit Potential (V)
Aflatoxin G2	331.1 [M+H] ⁺	245.1 (Quantifier)	50	58.0	263.0	42.1	16.1
		189.1 (Qualifier)	50	58.0	263.0	55.8	17.0
Aflatoxin G1	329.1 [M+H] ⁺	243.1 (Quantifier)	50	48.9	240.0	37.7	16.3
		283.2 (Qualifier)	50	48.9	240.0	35.6	7.4
Aflatoxin B2	315.0 [M+H] ⁺	287.1 (Quantifier)	50	51.2	286.0	36.0	7.8
		259.0 (Qualifier)	50	51.2	286.0	40.5	6.2
Aflatoxin B1	313.0 [M+H] ⁺	285.1 (Quantifier)	50	63.4	310.0	32.8	7.3
		241.1 (Qualifier)	50	63.4	310.0	51.3	16.0
Fumonisin B1	722.4 [M+H] ⁺	352.4 (Quantifier)	50	62.7	319.0	50.1	10.0
		334.4 (Qualifier)	50	62.7	319.0	55.7	9.5
Fumonisin B2	706.5 [M+H] ⁺	336.4 (Quantifier)	50	45.8	230.0	51.0	9.1
		318.4 (Qualifier)	50	45.8	230.0	55.1	9.0
Ochratoxin A	404.1 [M+H] ⁺	239.1 (Quantifier)	50	41.2	238.0	31.3	6.0
		357.9 (Qualifier)	50	41.2	238.0	20.1	8.9

Esempio di cromatogramma LC-MS/MS Ion Count per mais



Esempio di cromatogramma LC-MS/MS Ion Count per mangimi



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.

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