

# PuriTox Trichothecene

Cod Prodotto: TC-T220

Colonne di pulizia in fase solida da utilizzarsi con i sistemi LC-MS/MS.  
Solo per uso in vitro.

TC-T220/V5/12.08.21

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



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**



## Contenuto

	Pag
Principio del test .....	4
Reagenti non forniti .....	4
Accessori .....	4
Metodi raccomandati .....	4
Rischi .....	4
Decontaminazione .....	4
Conservazione e durata .....	5
Campionamento .....	5
Recuperi .....	5
Preparazione della soluzione di diluizione (Fase mobile A : Fase mobile B (80 : 20 v/v)) .....	5
Preparazione del campione .....	6
• Cereali e mangimi .....	6
Preparazione degli standard .....	7
• Soluzione di lavoro combinata .....	7
Curve di calibrazione Calibrazione abbinata alla matrice .....	8
Condizioni raccomandate per la LC .....	9
Esempio di cromatogramma di conteggio ionico totale LC-MS/MS per mais .....	10
Qualità .....	11
Supporto tecnico .....	11
Garanzia .....	11

## Principio del test

Le tossine sono estratte dal campione, filtrate e fatte passare attraverso la colonna di pulizia in fase solida.

Le colonne di pulizia a fase solida contengono materiale che aiutano a rimuovere sostanze interferenti o pigmenti da campioni di cereali. Le tossine sono estratte dal campione, filtrate e fatte passare attraverso la colonna di pulizia prima dell'analisi in LC-MS/MS.

La durata totale dell'operazione di pulizia è di ca. 20 minuti. Il test riduce l'interferenza di fondo e migliora quindi l'accuratezza dei risultati.

## Reagenti non forniti

- Solvente (Acetonitrile per HPLC e metanolo)
- Standard di micotossine (vedi capitolo sulla preparazione degli standard)
- Acetato di ammonio
- Acido Acetico

## Accessori

- Carta da filtro Whatman No. 113 oppure No. 4
- Filtro a membrana per siringhe da 0.2 µm

## Metodi raccomandati

Eventuali modifiche delle procedure analitiche descritte nelle presente manuale d'uso potrebbe influire sui risultati finali. Si prega di contattare il proprio distributore R-Biopharm di zona per ulteriori informazioni.

## Rischi

Le micotossine sono sostanze molto pericolose che devono essere analizzate solamente in laboratori attrezzati per manipolare materiali e solventi tossici. Durante le analisi è necessario indossare indumenti protettivi come camici, occhiali protettivi e guanti in lattice.

Conservare i solventi infiammabili in un armadietto antiesplorazione. Se necessario operare sotto cappa chimica e utilizzare attrezzature protettive.

Se necessario contattare il distributore R-Biopharm di zona per ulteriori informazioni sulle specifiche sulla sicurezza dei materiali.

## 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 2 anni dalla data di produzione se conservate a temperatura ambiente . Non congelare.

## Campionamento

Per il prelievo di campioni rappresentativi seguire una delle procedure di campionamento ufficialmente riconosciute. Si raccomanda di tritare finemente almeno 1 kg di campione rappresentativo e di prelevare una porzione (da 10 a 50 g a seconda del metodo impiegato) per l'estrazione.

## Recuperi

Qualora si desideri calcolare le perdite che si verificano durante l'estrazione, si raccomanda di analizzare un campione arricchito, costituito dello stesso materiale del campione da analizzare, che sarà lo standard di riferimento. I valori di recupero ottenuti col campione arricchito possono essere successivamente impiegati per correggere i risultati ottenuti con il campione utilizzato nel test.

## Preparazione della soluzione di diluizione (Fase mobile A : Fase mobile B (80 : 20 v/v))

La soluzione può essere conservata per 2 giorni se conservata a temperatura ambiente.

1. Aggiungere 80 ml di fase mobile A (acetato di ammonio 5 mM in acqua e acido acetico 0,2%) in un matraccio.
2. Aggiungere 20 ml di fase mobile B (acetato di ammonio 5 mM in metanolo e acido acetico 0,2%)

## Preparazione del campione

### • Cereali e mangimi

Questo metodo è stato testato su una serie di cereali tra cui frumento, mais, orzo e prodotti a base di cereali.

1. Introdurre 25 g di campione tritato in un vaso per miscelatore resistente ai solventi, capacità 1 litro.
2. Aggiungere 100 ml di acetonitrile all' 80 % e miscelare ad alta velocità per 3 minuti
3. Filtrare il campione con carta da filtro Whatman N. 113 o N. 4 oppure centrifugare a 4,000 rpm per 10 minuti.
4. Misurare 5 ml del filtrato nel cilindro della siringa.
5. Far passare l'estratto attraverso la colonna applicando una pressione con lo stantuffo e raccogliere il filtrato in una provetta di vetro. Far passare l'aria attraverso la colonna per rimuovere il liquido residuo.
6. Trasferire 2 ml della soluzione ripulita in una provetta di vetro ed portare a secco con un flusso d'aria a 60 - 70 °C.
7. Ricostituire con 1 ml di fase mobile A : fase mobile B (80:20 v/v). Miscelare tramite vortex per 2 - 3 minuti.
8. Passare il campione ricostituito attraverso un filtro per siringa da 0,2 µm.
9. Prelevare 675 µl di filtrato e aggiungere 75 µl di soluzione diluente. Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
10. Iniettare 40 µl nel sistema LC-MS/MS.

## Preparazione degli standard

**Nota:** Trilogy mette a disposizione un'ampia gamma di standard e materiali di riferimento cristallini o liquidi che possono essere utilizzati per la preparazione della serie di calibrazione abbinata alla matrice. Contatta il tuo distributore R-Biopharm locale per ulteriori informazioni

- **Soluzione di lavoro combinata**

1. Acquistare polvere cristallina contenente una miscela di tricoteceni. Contattare il distributore R-Biopharm locale per ulteriori informazioni. La polvere deve essere ricostituita secondo le istruzioni fornite e deve essere lasciata per una notte a temperatura ambiente per ottenere il concentrato stock.

Tricoteceni di Tipo A e di Tipo B	
Tipo A	Tipo B
T-2	Fusarenone X
HT-2	3-Acetildeossinivalenolo
Diacetossiscirpenolo	15-Acetildeossinivalenolo
Neosolaniolo	Deossinivalenolo
	Nivalenolo

2. Questa deve poi essere utilizzata per preparare una soluzione stock da 100.000 ng/ml.

## 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 otto punti (modificabile in base ai requisiti legislativi o ai livelli di contaminazione):

1. Aggiungere 1.5 ml di fase mobile A : fase mobile B (80:20 v/v) in una provetta in vetro
2. Eliminare 300 µl.
3. Standard 8: Aggiungere 300 µl di stock solution 100.000 ng/ml (equivalenti a 20.000 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
4. Standard 7: Prendere 1 ml di standard 8 e aggiungere 1 ml di fase mobile A: fase mobile B (80:20 v/v) (equivalente a 10.000 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
5. Standard 6: Prendere 1 ml di standard 7 e aggiungere 1 ml di fase mobile A: fase mobile B (80:20 v/v) (equivalente a 5.000 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
6. Standard 5: Prendere 1 ml di standard 6 e aggiungere 1 ml di fase mobile A: fase mobile B (80:20 v/v) (equivalente a 2.500 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
7. Standard 4: Prendere 1 ml di standard 5 e aggiungere 1 ml di fase mobile A: fase mobile B (80:20 v/v) (equivalente a 1.250 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
8. Standard 3: Prendere 1 ml di standard 4 e aggiungere 1 ml di fase mobile A: fase mobile B (80:20 v/v) (equivalente a 625 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
9. Standard 2: Prendere 1 ml di standard 3 e aggiungere 1 ml di fase mobile A: fase mobile B (80:20 v/v) (equivalente a 312,5 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
10. Standard 1: Prendere 1 ml di standard 2 e aggiungere 1 ml di fase mobile A: fase mobile B (80:20 v/v) (equivalente a 156,25 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.

## Calibrazione abbinata alla matrice

1. Preparare un bianco matrice utilizzando il protocollo per la preparazione dei campioni di cereali.
2. Raccogliere una quantità sufficiente di soluzione pulita dal passaggio 8 della preparazione dei campioni di cereali per preparare una serie di calibrazioni legate alla matrice. Ad esempio, far passare il campione attraverso 12 colonne Puritox Tricothecene separate e raccogliere la soluzione.
3. Standard 8: Prelevare 100 µl della soluzione da 20.000 ng/ml ed aggiungere 900 µl del bianco matrice raccolto (equivalente a 2.000 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
4. Standard 7: Prelevare 100 µl del solvente della curva di calibrazione (standard 7) come precedentemente preparato. Aggiungere 900 µl del bianco matrice raccolto (equivalente a 1.000 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
5. Standard 6: Prelevare 100 µl del solvente della curva di calibrazione (standard 6) come precedentemente preparato. Aggiungere 900 µl del bianco matrice raccolto (equivalente a 500 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.

6. Standard 5: Prelevare 100 µl del solvente della curva di calibrazione (standard 5) come precedentemente preparato. Aggiungere 900 µl del bianco matrice raccolto (equivalente a 250 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
7. Standard 4: Prelevare 100 µl del solvente della curva di calibrazione (standard 4) come precedentemente preparato. Aggiungere 900 µl del bianco matrice raccolto (equivalente a 125 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
8. Standard 3: Prelevare 100 µl del solvente della curva di calibrazione (standard 3) come precedentemente preparato. Aggiungere 900 µl del bianco matrice raccolto (equivalente a 62.5 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
9. Standard 2: Prelevare 100 µl del solvente della curva di calibrazione (standard 2) come precedentemente preparato. Aggiungere 900 µl del bianco matrice raccolto (equivalente a 31.25 ng/ml di ciascuna tossina). Miscelare tramite vortex per 20 secondi.
10. Standard 1: Prelevare 100 µl del solvente della curva di calibrazione (standard 1) come precedentemente preparato. Aggiungere 900 µl del bianco matrice raccolto (equivalente a 15.625 ng/ml di ciascuna

### Condizioni raccomandate per la LC

Condizioni per LC			
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: 5 mM Ammonium Acetate in Water and 0.2 % Acetic Acid Solution B: 5 mM Ammonium Acetate in Methanol and 0.2 % Acetic Acid Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	90	10
	15	20	80
	16	5	95
	17	5	95
	18	90	10
	20	90	10
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.275 ml per minute		
Column Heater	Maintain guard and analytical columns at 45 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	40 µl		

### Condizioni di spettrometria di massa

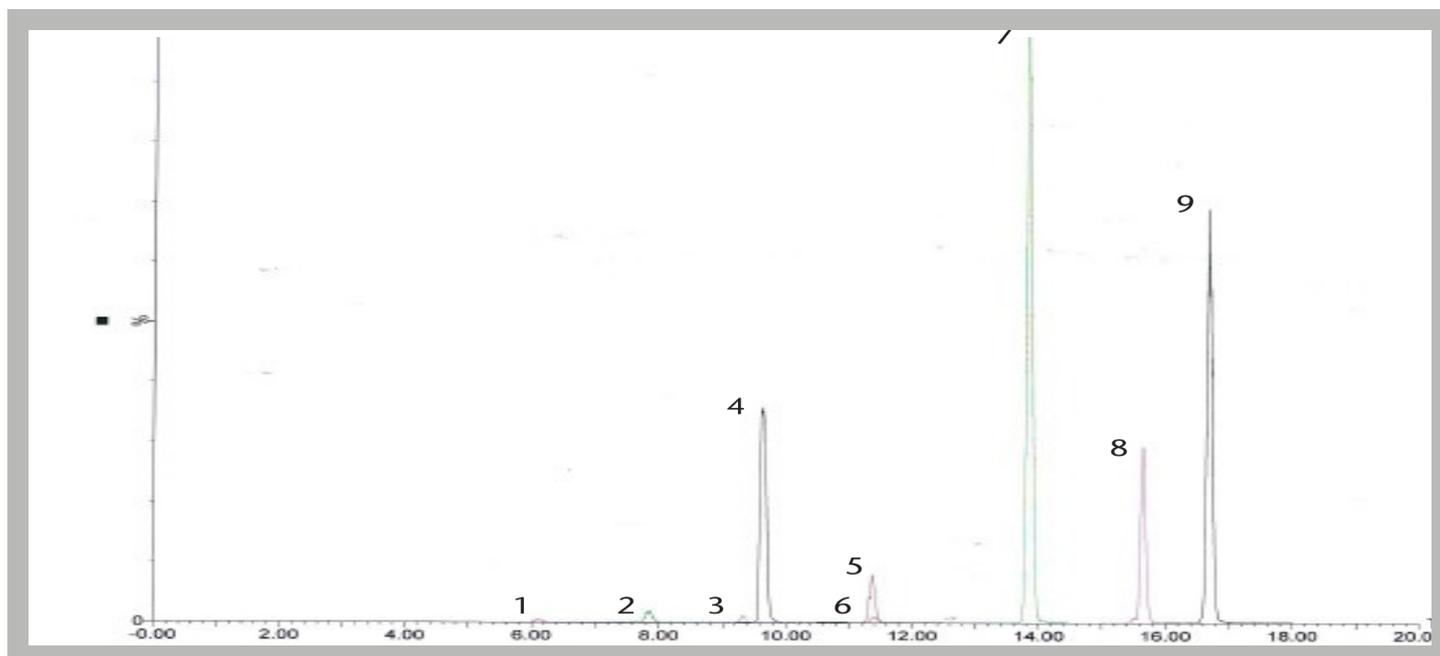
Instrument	Waters® ACQUITY TQ Detector with Electrospray Ionisation
Mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM) Mode
Capillary Voltage	+1,700 Volts
Source Temperature	150 °C
Desolvation Gas Temperature	350 °C
Desolvation Gas Flow	600 l/hr (N)
Cone Gas Flow	50 l/hr (N)

### Impostazione dello strumento

Time (min)	Toxin	Precursor Ion (m/z)	Product Ions (m/z)	Dwell Time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Voltage (eV)
4.8 - 6.8	NIV	313.15 [M+H] <sup>+</sup>	205.14 (Quantifier) 159.07 (Qualifier)	0.161	23 23	11 21
6.8 - 8.8	DON	297.16 [M+H] <sup>+</sup>	249.18 (Quantifier) 203.12 (Qualifier)	0.050	25 25	11 15
8.0 - 10.0	FUS X	355.13 [M+H] <sup>+</sup>	247.00 (Quantifier) 229.00 (Qualifier)	0.050	30 30	12 12
8.5 - 10.5	NEO	400.19 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	305.00 (Quantifier) 215.00 (Qualifier)	0.045	30 30	12 12
10.0 - 12.0	15-Ac DON	339.17 [M+H] <sup>+</sup>	137.06 (Quantifier) 321.18 (Qualifier)	0.045	25 25	11 11
10.0 - 12.0	3-Ac DON	337.23 [M-H] <sup>-</sup>	317.18 (Quantifier) 173.05 (Qualifier)	0.045	29 29	11 9
12.5 - 14.5	DAS	384.18 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	307.19 (Quantifier) 105.06 (Qualifier)	0.161	18 18	12 26
14.5 - 16.5	HT-2	442.20 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	215.10 (Quantifier) 263.10 (Qualifier)	0.078	22 22	14 16
15.5 - 17.5	T-2	484.25 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	185.00 (Quantifier) 215.00 (Qualifier)	0.078	28 28	14 14

### Esempio di cromatogramma di conteggio ionico totale LC-MS/MS per mais

Peak	Toxin	Spike Level
1	NIV	200 ppb
2	DON	200 ppb
3	FUS X	200 ppb
4	NEO	200 ppb
5	15-Acetyl DON	200 ppb
6	3-Acetyl DON	200 ppb
7	DAS	200 ppb
8	HT-2	200 ppb
9	T-2	200 ppb



## Qualità

I prodotti RBR sono sviluppati, prodotti, verificati e spediti in accordo con le normative dei sistemi registrati di gestione della qualità ISO 9001 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 s peso 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