

AOAC Official
Final Action
Method
2016.02

Product referenced

EASI-EXTRACT[®] BIOTIN

Product Code: P82 / P82B

Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC.
For in vitro use only.

P82/V14/DRAFT

www.r-biopharm.com



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Contenuto

	Pag
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	4
Preparazione della Colonna	4
Inversione del Flusso	5
Preparazione del Tampone Fosfato 0.1 M	5
Preparazione della Soluzione di Ascorbato di Sodio al 10 %	5
Preparazione della Soluzione A in Fase Mobile (Contenente TFA allo 0.025 % : Acenitrile (90 : 10 v/v))	5
Preparazione della Soluzione di Diluizione	6
Preparazione del Campione	7
• Polveri per l'Infanzia, Prodotti Pronti all'uso e Cereali per l'Infanzia	7
Preparazione dello Standard di Biotina	8
Curva di Calibrazione.....	8
Raccomandazioni per l'HPLC.....	9
Esempio di Cromatogramma in HPLC per alimenti per l'infanzia.....	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 3 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 (adatta per HPLC, es. MilliQ)
- Solventi (metanolo e acetonitrile per HPLC - adatto per l'uso con UV HPLC)
- Standard di biotina (si prega di far riferimento alla sezione relativa alla preparazione degli standard)
- Tampone fosfato PBS (RP202)*
- Idrossido di sodio
- Ascorbato di sodio
- Fosfato di sodio monobasico
- Fosfato di sodio bibasico eptaidrato
- Acido trifluoroacetico (TFA)
- Pancreatina tipo (Merck 107130)*

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

Prodotti Accessori

- Carta da filtro Whatman S&S 587 ½
- 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

Durante l'analisi 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.

Le colonne contengono Thimerosal al 0,01 % (w/v). In caso di contatto con la pelle o con gli occhi sciacquare la parte abbondantemente. 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.

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 biotina compresa tra 0.3 - 1.0 µg. Non eccedere oltre a 0.95 µg poiché tale valore è troppo vicino alla capacità della colonna.

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 contenete 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 del Tampone di Sodio Fosfato 0.1 M

Il tampone può essere conservato per 5 giorni se tenuto a temperatura ambiente.

1. Pesare 4.68 g di fosfato di sodio monobasico (anidro) e 16.37 g di fosfato di sodio di basico eptaidrato in un idoneo contenitore.
2. Portare a 1 L con acqua.
3. Verificare che il pH sia a 7.0.

Preparazione della Soluzione di Ascorbato di Sodio al 10 %

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

1. Pesare 10 g di ascorbato di sodio in un idoneo contenitore.
2. Portare a 100 ml con acqua.

Preparazione della Soluzione A in Fase Mobile (Contenente TFA allo 0.025 % : Acetonitrile (90 : 10 v/v))

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

1. Aggiungere 1L di acqua in un idoneo contenitore.
2. Eliminarne 250 µl.
3. Aggiungere 250 µl di acido trifluoroacetico (TFA).
4. Eliminare 100 ml.
5. Aggiungere 100 ml di acetonitrile al 100 %.

Preparazione della Soluzione di Diluizione (Contenente TFA allo 0.025 % : Acetonitrile (95 : 5 v/v))

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

1. Aggiungere 1L di acqua in un idoneo contenitore.
2. Eliminarne 250 μ l.
3. Aggiungere 250 μ l di acido trifluoroacetico (TFA).
4. Eliminare 50 ml.
5. Aggiungere 100 ml di acetonitrile al 100 %.

Preparazione del Campione

Questo sistema analitico si basa sul metodo ufficiale AOAC 2016.02

• Formule per l'Infanzia, Prodotti Pronti all'uso e Cereali per l'Infanzia, Latte

1. Introdurre 1 - 5 g di campione in un flacone di vetro ambrato con tappo a vite da 100 ml.
2. Aggiungere 50 ml di tampone fosfato 0.1 M a pH 7.0.
3. Introdurre il flacone in un agitatore magnetico e aggiungere 4 g di pancreatina. Lasciare in agitazione per 10 minuti.
4. Aggiungere 6 ml della soluzione al 10 % di ascorbato di sodio e lasciare il campione in agitazione per altri 5 minuti.
5. Incubare il campione in un bagnomaria con agitatore a 37 °C per 2 ore.
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 fosfato 0.1 M.
8. Centrifugare il campione per 15 minuti a 4,000 rpm e filtrare il surnatante ottenuto con un filtro Whatman S&S 597½.

Nota: La biotina viene determinata utilizzando un rilevatore UV che deve essere impostato ad una lunghezza d'onda piuttosto bassa. A causa di questa bassa lunghezza d'onda, ci possono essere molte interferenze di fondo sul cromatogramma che possono essere ridotte durante l'estrazione e la purificazione del campione. E' pertanto fondamentale rimuovere i particolati ed i precipitati mediante un passaggio di centrifugazione seguito dalla filtrazione.

9. In base al tipo di matrice da analizzare, far passare un idoneo volume di filtrato (5 -30 ml) attraverso la colonna con un flusso di 2 ml al minuto (oppure è possibile far passare la campione attraverso la colonna per gravità). Per la "cattura" della vitamina da parte dell'anticorpo è essenziale applicare una pressione lenta e costante.
10. Lavare la colonna facendo passare 20 ml di tampone salino fosfato (PBS) attraverso seguito da 10 ml di acqua con un flusso di circa 5 ml per minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni liquido residuo.

Nota: se richiesto, il volume di PBS e acqua può essere aumentato per rimuovere dalla colonna ogni materiale non- specifico che potrebbe interferire con una accurata determinazione della biotina.

11. Eluire la vitamina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 2 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. Portare a secco l'eluato sotto flusso di azoto (o aria) a 80 - 90 ° C.

Nota: Il flusso di azoto (o aria) deve essere regolato delicatamente, in modo da velocizzare l'evaporazione del solvente ma senza perdere liquido dalla provetta in vetro

13. Ricostituire con 1 ml di soluzione diluente. Miscelare tramite vortex per 20 secondi.

Note: E' essenziale che il campione venga ricostituito immediatamente dopo l'evaporazione. Non lasciare il campione sotto il flusso di azoto (o aria) una volta portato a secco.

14. Introdurre 100 µl in un sistema HPLC.

Preparazione dello Standard di Biotina

1. E' possibile acquistare D-Biotina in polvere. Disciogliere la polvere per ottenere una concentrazione di 100 µg/ml e lasciare in agitazione a 2 – 8 °C per tutta la notte per ottenere una soluzione stock. Tutti gli standard dovrebbero essere preparati in flaconi di vetro ambrato.

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.

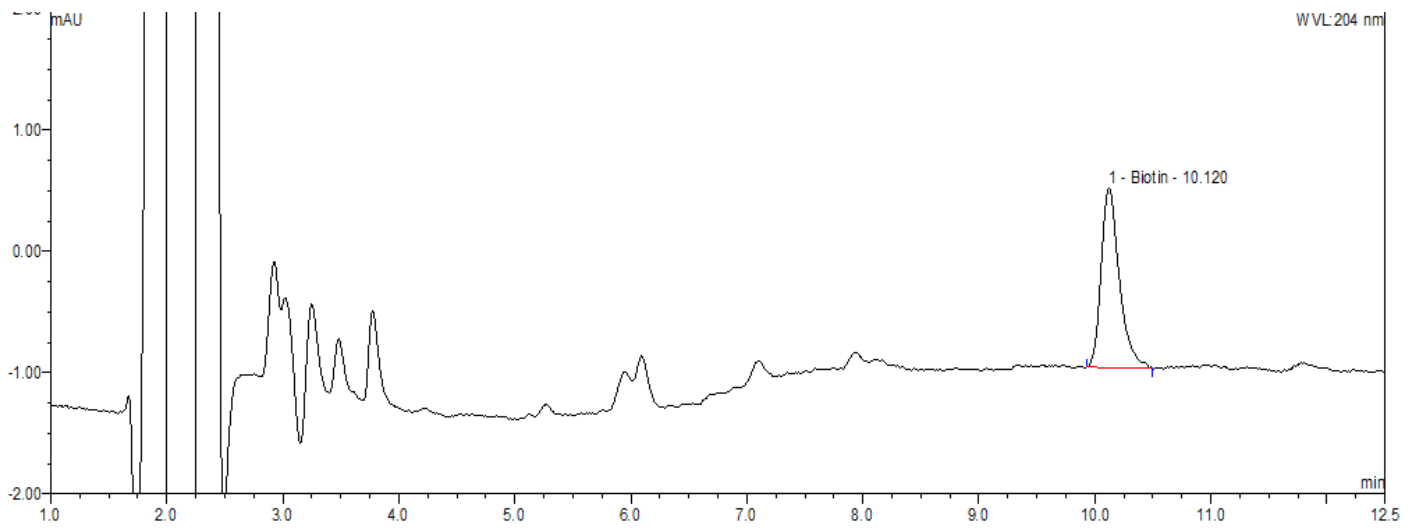
Esempio di come preparare una curva di calibrazione a sei punti (si possono apportare variazioni in base al contenuto di vitamina atteso):

1. Standard 6: Prelevare 250 µl dello standard di biotina e portarli a 50 ml con la soluzione di diluizione (equivalente a 0.5 µg/ml).
2. Standard 5: Prelevare 4 ml dei 500 ng/ml e portarli a 5 ml con la soluzione di diluizione (equivalente a 0.4 µg/ml).
3. Standard 4: Prelevare 3.75 ml dei 400 ng/ml e portarli a 5 ml con la soluzione di diluizione (equivalente a 0.3 µg/ml).
4. Standard 3: Prelevare 3.33 ml dei 300 ng/ml e portarli a 5 ml con la soluzione di diluizione (equivalente a 0.2 µg/ml).
5. Standard 2: Prelevare 2.5 ml dei 200 ng/ml e portarli a 5 ml con la soluzione di diluizione (equivalente a 0.1 µg/ml).
6. Standard 1: Prelevare 2.5 ml dei 100 ng/ml e portarli a 5 ml con la soluzione di diluizione (equivalente a 0.05 µg/ml).
7. Iniettare 100 µl di ciascuna soluzione nell'HPLC.

Raccomandazioni per l'HPLC

HPLC Conditions			
Guard Cartridge	KrudKatcher 0.5 µm depth filter or equivalent		
Analytical Column	Thermo Accucore C18 2.6 µm, 4.6 mm x 150 mm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: water containing 0.025 % TFA : acetonitrile (90 : 10 v/v) Solution B: Acetonitrile Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	100	0
	10	100	0
	12	60	40
	13.5	100	0
	26	100	0
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.7 ml per minute		
UV Detector	204 nm / 210 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 alimenti per l'infanzia



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