

RIDA[®] Ochratoxin A column

Immunaффинitätssäulen für die Probenvorbereitung
zum Nachweis von Ochratoxin A

Immunoaffinity column for sample clean up prior to
analysis of ochratoxin A

Art. No.: R1303

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstr. 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

RIDA[®] und RIDASCREEN[®]
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA[®] and RIDASCREEN[®]
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDA® Ochratoxin A column (Art. Nr.: R1303) sind Immunaффinitätssäulen für die Probenvorbereitung zum Nachweis von Ochratoxin A in Lebens- und Futtermitteln.

R1303 enthält 10 Immunaффinitätssäulen für den einmaligen Gebrauch.

Gelmatrix:	Sepharose
Antikörper:	an Sepharose gekoppelte monoklonale Antikörper
Max. aufzutragendes Volumen:	60 ml
Flussrate:	1 Tropfen/sec
Nachweisgrenze:	abhängig von der aufgetragenen Probenmenge und der Nachweismethode
Säulenkapazität:	ca. 200 ng Ochratoxin A

1. Allgemeines

RIDA® Ochratoxin A column können in Kombination mit den Enzymimmunoassays (R1311, RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 und R5402, RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A) zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A eingesetzt werden.

Die Probenvorbereitung wird mit dem Einsatz von Immunitätssäulen wesentlich vereinfacht, und man erhält sehr reine Extrakte, die mit den unterschiedlichsten Analysemethoden untersucht werden können.

2. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion.

Die Säule enthält eine Gel-Suspension, an die monoklonale Antikörper spezifisch für Ochratoxin A kovalent gebunden sind.

- A: Die Probe wird aufgetragen; ist Ochratoxin A im Probenextrakt vorhanden, wird es von den monoklonalen Antikörpern gebunden.
- B: Alle anderen Substanzen werden nicht gebunden und passieren die Säule.
- C: Gebundenes Ochratoxin A wird aus dem Antigen-Antikörper-Komplex mit Methanol eluiert. Durch Methanol werden die Antikörper denaturiert und setzen dabei das Antigen (Ochratoxin A) frei.

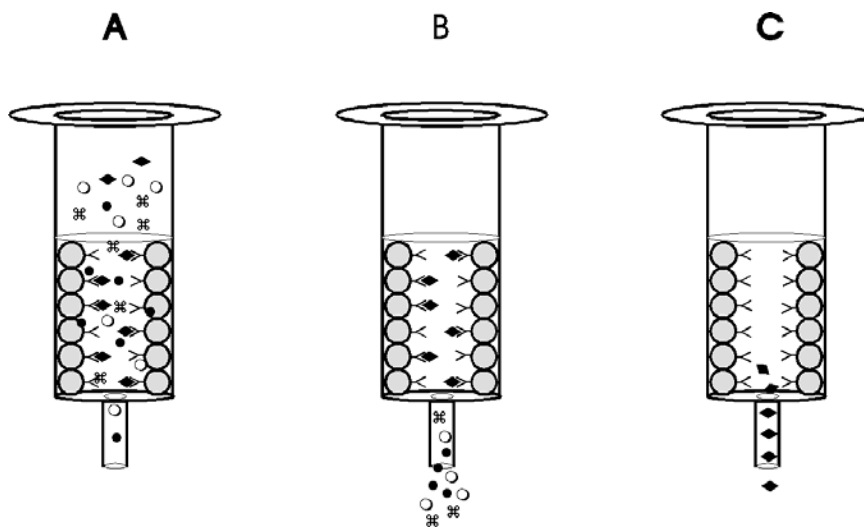


Abb. 1: Prinzip einer Immunitätssäule

3. Packungsinhalt

Mit den Immunaффinitätssäulen können 10 Probenaufarbeitungen (pro Säule eine Probenaufarbeitung) durchgeführt werden. Jeder Testkit enthält:

10 Immunaффinitätssäulen

4. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

4.1. Geräte

- Laborwaage
- Labor-, Getreide- oder Kaffeemühle
- Zentrifuge
- Schüttler
- Magnetrührer
- Papierfaltenfilter
- Einmal-Kunststoffspritzen (zur Probenaufgabe)
- optional: Vakuumextraktionsgerät zur gleichzeitigen Verwendung mehrerer Säulen
- Messpipetten
- Pasteurpipetten
- variable 20 µl - 200 µl- und 200 - 1000 µl-Mikropipetten

4.2. Reagenzien

- Methanol
- Acetonitril
- n-Heptan (oder Hexan)
- 20 mM PBS/Methanol, pH: 7,4 (90/10 (v/v)):
0,55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl
ad 1 l dest. Wasser/Methanol (90/10)
- 0,13 M Natriumhydrogencarbonat Puffer, pH 8,1:
10,92 g NaHCO_3 ad 1 l dest. Wasser, der pH stellt sich auf ca. 8,1 ein

5. Vorsichtsmaßnahmen

Ochratoxin A ist eine toxische und krebserregende Substanz. Vorsicht ist geboten. Hautkontakt vermeiden (Handschuhe tragen).

Die Dekontamination der Glasgeräte und toxischen Lösungen erfolgt am zweckmäßigsten mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (10 % (v/v)) über Nacht (Lösung mit HCl auf pH 7 einstellen).

6. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Immunaффinitätssäulen bei 2 - 8 °C lagern - auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Säulen im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

7. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Ochratoxin A ist lichtempfindlich, deshalb die Proben und die Probenextrakte vor direkter Lichteinwirkung schützen.

In der folgenden Extraktionsvorschrift wird eine Extraktmenge, die 1 g Probe entspricht, auf die Säule aufgetragen. Durch Variieren dieser Menge kann die Nachweisgrenze in Abhängigkeit von der Analysenmethode erhöht oder erniedrigt werden.

7.1. Getreide und Malz

- 10 g der gemahlten Probe in ein verschraubbares Gefäß einwiegen und mit 20 ml Acetonitril/Wasser (60/40 (v/v)) versetzen
- 20 min gründlich mischen (horizontale Lage)
- mit einer Nutsche über Papierfilter absaugen und das Filtrat auffangen
- zur Entfettung 5 ml Filtrat mit 5 ml n-Heptan versetzen
- 5 - 10 min mischen
- zentrifugieren: 5 min / 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- die obere Heptanphase vollständig absaugen
- 2 ml des entfetteten Filtrats (entspricht 1 g Probe) mit 13 ml PBS-Puffer verdünnen
- die so vorbereitete Probenlösung (= 15 ml) vollständig auf die Säule auftragen

Anmerkung:

Auf Anfrage sind folgende Applikationen für RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (R1311) in Kombination mit den RIDA® Ochratoxin A column erhältlich:

- für Rohkaffee und Röstkaffee
- für Wein
- für Trockenfrüchte

Auf Anfrage sind folgende Applikationen für RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (R5402) in Kombination mit den RIDA® Ochratoxin A column erhältlich:

- für Rohkaffee
- für Wein
- für Trockenfrüchte

Mit den RIDA® Ochratoxin A column können auch Proben, die nach anderen Vorschriften extrahiert wurden, analysiert werden. Voraussetzung ist allerdings, dass die zu untersuchende Probe in einer wässrigen Lösung mit maximal 10 % Methanol vorliegt.

8. Reinigung mit RIDA® Ochratoxin A column

8.1. Testvorbereitungen

Die benötigte Anzahl an Säulen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Nicht verwendete Säulen sofort wieder im verschlossenen Originalbeutel bei 2 - 8 °C lagern.

Anmerkung:

Die Säulen werden ohne Adapter für das Probenreservoir geliefert.

Die Säulen sind mit einem Plastikverschluss oben und unten versehen, der vor Gebrauch entfernt werden muss. Der über der Gelmatrix stehende Lagerpuffer wird mit dem ersten Waschvorgang ausgewaschen.

Die Säulen sollten während des Gebrauchs nicht austrocknen. Ausnahmen sind unter Punkt 8.2. Schritt 9 (kurzzeitiges Entleeren der Säule vor Elution) und Schritt 13 (vollständiges Entleeren der Säule nach Elution)

Bei zu hoher Druckerwendung bzw. zu starkem Vakuum im Vakuumextraktionsgerät auf die Säule kann das Gel komprimiert werden und daraus eine niedrigere Wiederfindungsrate resultieren.

8.2. Durchführung

Die Säulen nicht trocken laufen lassen !

1. die Säule mit 2 ml PBS/Methanol (90/10) waschen
2. die Säule mit ca. 1 ml Probelösung füllen
3. einen passenden Adapter auf das obere Ende der Säule aufstecken und eine Einmal-Kunststoffspritze als Probenreservoir aufstecken
4. den restlichen Probenextrakt in das Reservoir füllen
5. den Probenextrakt langsam und gleichmäßig durch die Säule drücken (Durchflussrate: ca. 1 Tropfen/sec) bzw. bei Gebrauch eines Vakuumextraktionsgerätes durch die Säule saugen
6. den Durchlauf verwerfen
7. die Säule mit 10 ml PBS/Methanol (90/10) waschen
8. den Durchlauf verwerfen
9. durch Nachdrücken von Luft oder N₂ sicherstellen, dass die Flüssigkeit vollständig aus der Säule entfernt wird
10. Probenreservoir entfernen und ein sauberes, verschließbares Auffanggefäß unter die Säule stellen
11. Elution mit 1 ml Methanol (100 %); Methanol **langsam** durch die Säule drücken (Durchflussrate: ca. 1 Tropfen/sec), um sicherzustellen, dass das gesamte Toxin von den Antikörpern gelöst wird
12. bei zu schneller Passage (schneller als 10 sec) wird das Eluat aufgenommen und nochmals auf die Säule aufgetragen.
13. Eluatreste durch Absaugen oder Nachdrücken von Luft aus der Säule gewinnen (30 sec)

9. Nachweis und Quantifizierung

9.1. RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (R1311)

- das toxinhaltige Eluat (entspricht 1 g Getreide/Malz) vollständig bei ca. 60 °C evaporieren (möglichst unter schwachem N₂-Strom unter dem Abzug)
- den trockenen Rückstand in 1 ml 0,13 M Natriumcarbonatpuffer aufnehmen und dabei gründlich lösen (Vortex oder 3 - 5 min im Ultraschallbad)
- 50 µl pro Kavität im RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 -Test einsetzen

Bitte beachten:

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Ochratoxin A-Konzentration in ng/kg zu erhalten, muss die aus der Eichkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Werden, wie unter 7. Probenvorbereitung angegeben, 15 ml Getreide/Malz-extrakt auf die Säule aufgetragen, resultiert daraus folgender Verdünnungsfaktor:

Getreide/Malz: 1

Messbereich: zwischen 50 ng/kg (ppt) und 1800 ng/kg (ppt)

Hinweise zur Aufbewahrung von Proben und Probenextrakten:

Originalproben: stets kühl, trocken, lichtgeschützt und gut verschlossen aufbewahren

Methanol-Eluat: lichtgeschützt und kühl aufbewahren; lichtgeschützt und eingefroren für zwei bis drei Monate lagerfähig

Probenextrakte in NaHCO₃-Puffer (s. 9.1. nach Evaporation des Eluats) nur ca. 2 - 3 Tage bei 2 - 8 °C haltbar

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDA[®] Ochratoxin A column

Brief information

RIDA[®] Ochratoxin A column (Art. No.: R1303) are immunoaffinity columns for sample clean up prior to analysis of Ochratoxin A in food and feed.

R1303 contains 10 immunoaffinity columns for single use.

Gel suspension:	Sepharose
Antibody:	monoclonal antibody conjugated to Sepharose
Max. applied volume:	60 ml
Flow rate:	1 drop/sec
Detection limit:	depending on sample volume applied and on detection method
Capacity of the column:	approx. 200 ng ochratoxin A

1. General

RIDA® Ochratoxin A column are usable in combination with the enzyme immunoassays (R1311, RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 and R5402, RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A) for the quantitative determination of Ochratoxin A.

The sample preparation with the immunoaffinity columns simplifies and enhances the sample clean up procedure. Pure extracts are obtained, which can be analyzed by different analytical methods.

2. Test principle

The basis is the antigen-antibody reaction.

The column contains a gel suspension to which monoclonal antibodies are attached covalently. The antibodies are specific for the Ochratoxin A.

- A: The sample is applied and is passed through the column. If Ochratoxin A is present in the sample, it will be bound by the monoclonal antibodies.
- B: All other substances will not be retained on the column.
- C: Using methanol as eluent the Ochratoxin A will be released from the antigen-antibody-complex. Methanol causes a denaturation of the antibodies. Therefore, the antigen (Ochratoxin A) is set free and can be eluted.

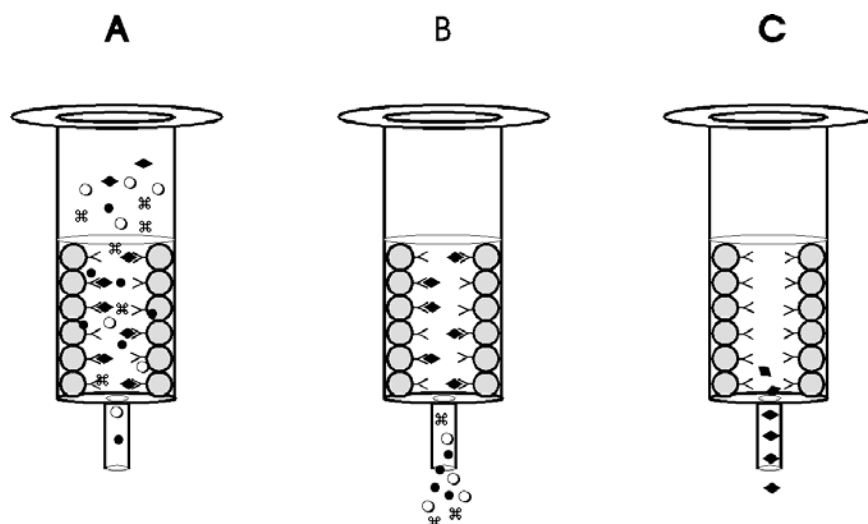


Fig. 1: Principle of an immunoaffinity column

3. Reagents provided

With the immunoaffinity columns 10 sample preparations respectively could be done (one sample preparation per column). Each test kit contains:

10 immunoaffinity columns

4. Material required but not provided

4.1. Equipment

- laboratory balance
- grinder (mill) or coffee mill
- centrifuge
- shaker
- magnetic stirrer
- filter paper
- one way plastic syringes (as sample reservoir)
- optional: vacuum unit for simultaneous use of several columns
- graduated pipettes
- pasteur pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

4.2. Reagents

- methanol
- acetonitrile
- n-heptane (or hexane)
- 20 mM PBS/methanol, pH 7.4 (90/10 (v/v)):
0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl, fill up to 1 l with distilled water/methanol (90/10)
- 0.13 M sodium hydrogen carbonate buffer, pH 8.1:
10.92 g NaHCO_3 fill up to 1 l with distilled water, the pH will be approx. at 8.1

5. Warnings and precautions for the users

Ochratoxin A is a toxic and carcinogenic substance. Particular care should be taken. Avoid contact with the skin (use gloves).

Decontamination of the glassware and toxin-content solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 % (v/v)) overnight (adjust solution with HCl to pH 7).

6. Storage instructions

Store the immunoaffinity columns at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) - DO NOT FREEZE.

Return any unused columns to their original foil bag and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

7. Preparation of samples

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

Ochratoxin A is light sensitive, therefore, avoid exposure of the samples and sample extracts to direct light.

With the following extraction protocol the actual volume of the sample passed through the column is equivalent to 1 g of starting commodity. The detection limit depending on the analytical method can be increased or decreased in the variation of this amount.

7.1. Cereals and malt

- weigh 10 g of ground sample into a screwable vial and add 20 ml of acetonitrile/water (60/40 (v/v))
- mix well for 20 min (horizontal position preferably)
- filter the solution through filter paper by using a frit and keep the filtrate
- for degreasing add 5 ml of n-heptane to 5 ml of the filtrate
- mix for 5 - 10 min
- centrifuge: 5 min / 3000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- remove the upper heptane layer completely
- dilute 2 ml of the degreased filtrate (equivalent to 1 g of sample) with 13 ml PBS buffer
- pass the entire amount (= 15 ml) of the sample solution through the column

Remark:

Further application notes for RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (R1311) in combination with RIDA® Ochratoxin A column are available on request. Please contact your local distributor.

- for green and roasted coffee
- for wine
- for dried fruits

Further application notes for RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (R5402) in combination with RIDA® Ochratoxin A column are available on request. Please contact your local distributor.

- for green coffee
- for wine
- for dried fruits

Samples prepared by other methods can also be used for analysis with the RIDA® Ochratoxin A column. However, these samples have to be provided in aqueous solutions containing maximum 10 % methanol.

8. Separation with RIDA® Ochratoxin A column

8.1. Preliminary comments

Bring the columns to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

Return unused columns to 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F), into the original bag.

Remark:

The columns are delivered without an adapter for sample reservoir.

The columns are plugged with caps on top and tip, which have to be removed prior to use. The storage buffer above the gel is rinsed off within the first washing step.

The columns must not dry up during usage. Exceptions are in section 8.2. step 9 (brief removal of residual fluid in the column gel prior to elution) and step 13 (complete removal of residual fluid after elution).

Excessive pressure on the column may cause compression of the gel and consequently low recoveries.

8.2. Clean up

Do not let the columns dry up!

1. equilibrate the column by rinsing with 2 ml PBS/methanol (90/10)
2. fill the column with approx. 1 ml sample extract
3. attach suitable adapter on top of the column and use syringe as sample reservoir
4. fill syringe with the residual sample extract
5. pass sample extract slowly and continuously through the column (flow rate: approx. 1 drop/sec), use positive pressure with syringe or absorb when using vacuum unit
6. discard the passed solution
7. rinse the column with 10 ml PBS/methanol (90/10)
8. discard the passed solution
9. ensure that all liquid is removed from the column by pressing air or N₂ through the column
10. remove syringe and place a clean and closable vial directly below the column
11. elute with 1 ml methanol (100 %); methanol has to pass **slowly** through the column (flow rate: approx. 1 drop/sec) to ensure complete elution of the toxin
12. if the eluent passed too fast (faster than 10 sec), collect the eluate and pass it again through the column
13. press air thoroughly through the column or absorb with vacuum for 30 sec to collect all eluat residues

9. Detection and quantification

9.1. RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 (R1311)

- evaporate the toxin containing eluate (equivalent to 1 g cereals/malt) to complete dryness at approx. 60 °C (140 °F), if possible by means of a weak nitrogen stream
- redissolve the dried residue in 1 ml of 0.13 M sodium hydrogen carbonate buffer and dissolve thoroughly (vortex or 3 - 5 min in an ultrasonic bath)
- use 50 µl per well in the RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 assay

Please note:

In order to obtain the ochratoxin A concentration in ng/kg actually contained in a sample the concentration read from the calibration curve has to be multiplied by the corresponding dilution factor.

If 15 ml of cereals/malt extract is passed through the column in accordance with the protocol given in 7. Preparation of samples, the resulting dilution factor is as follows:

cereals/malt: 1

measuring range: between 50 ng/kg (ppt) and 1800 ng/kg (ppt)

remarks for storage of samples and sample extracts:

original samples: always keep refrigerated, dry, protected against light and well sealed

methanolic eluates: store in a cool place protected against light; protected against light and frozen the eluate can be stored for 2 to 3 months

store sample extracts in sodium hydrogen carbonate buffer (see 9.1. after evaporation of the eluate) at 2 - 8 °C (35.6 - 45.4 °F) only for 2 - 3 days

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.