

AFLAOCHRA PREP[®]

Produktcode: P89 / P89B

Immunoaffinitätssäulen für die Verwendung zusammen mit HPLC oder LC-MS/MS.
Nur für den In-vitro-Gebrauch.

P89/V15/27.05.22

Inhalt

	Seite
Testprinzip	4
Nicht enthaltene Reagenzien	4
Zubehörprodukte	4
Gefahren	4
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise	5
Dekontamination	5
Lagerung & Mindesthaltbarkeit	5
Probennahme	5
Sensitivität	5
Wiederfindungen	5
Säulenvorbereitung	5
Elution	6
Probenvorbereitung	7
• Getreide	7
• Gewürze und Trockenfrüchte	8
Zubereitung von Standards	9
Kalibrierkurve	9
Empfohlene Bedingungen für HPLC	10
Beispiel für HPLC-Chromatogramme	11
• Mais	11
• Paprika	11
Empfohlene Bedingungen für LC-MS/MS	12
Beispiel für LC-MS/MS Chromatogramme	13
• Mais	13
• Paprika	13
Qualität	14
Technischer Support	14
Garantie	14

Testprinzip

Das Verfahren basiert auf einer monoklonalen Antikörpertechnologie, die für einen äußerst spezifischen, sensitiven, schnellen und einfach durchzuführenden Test sorgt.

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension monoklonaler Antikörper, die für die betreffenden Toxine spezifisch sind. Nach der Extraktion der Toxine wird der Probenextrakt filtriert, verdünnt und langsam durch die Immunoaffinitätssäule geleitet. Jegliche in der Probe vorhandenen Toxine werden durch den Antikörper in der Gelsuspension gebunden. Die Säule wird gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen, und die Toxine werden dann nach der Elution mit Lösungsmittel aus der Säule freigegeben. Das Eluat wird aufgefangen und vor der Analyse durch HPLC oder LC-MS/MS injiziert. Aflatoxine müssen bei Analyse durch HPLC derivatisiert werden.

Die gesamte Extraktions- und Aufreinigungszeit beträgt etwa 20 Minuten. Das Ergebnis ist verbesserte Reinheit und Konzentration der Toxine von Lebensmittel- und Futterproben, was ein viel reineres Chromatogramm liefert und daher für eine genauere und sensiblere Detektion sorgt. Die Säulen haben außerdem den zusätzlichen Vorteil, dass sie für die umfangreiche Analyse von Proben automatisiert werden können.

Nicht enthaltene Reagenzien

- Destilliertes / deionisiertes Wasser (geeignet für die Verwendung mit HPLC, z. B. MilliQ)
- Lösungsmittel (Methanol in HPLC-Qualität)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (RP202)*
- Mykotoxin-Standards (siehe Abschnitt „Vorbereitung von Standards“)
- Natriumchlorid
- Natriumhydroxid (zur pH-Wert-Einstellung des Filtrats, falls erforderlich)
- Salpetersäure (nur bei Derivatisierung mit einer KOBRA® CELL erforderlich)
- Kaliumbromid (nur bei Derivatisierung mit einer KOBRA® CELL erforderlich)

Zubehörprodukte

- Filterpapier Whatman Nr. 113 oder Nr. 4
- Glasmikrofaser-Filterpapier
- KOBRA® CELL (K01)*
- Immunoaffinitätssäulenständer (CR1)*
- Immunoaffinitätszubehörpaket (AP01)*

* Erhältlich von R-Biopharm. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

Gefahren

Mykotoxine sind sehr gefährliche Stoffe. Analysen sollten nur von Labors durchgeführt werden, die für die Handhabung toxischer Materialien und Lösungsmittel ausgestattet sind. Während der gesamten Analyse geeignete Schutzkleidung, einschließlich Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel, tragen.

Brennbare Lösungsmittel in einem explosionssicheren Schrank aufbewahren. Ggf. Laborabzug und Schutzausrüstung verwenden.

Ein Sicherheitsdatenblatt mit weiteren Informationen erhalten Sie von Ihrem R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise

Es sind Methoden für alle gesetzlich vorgeschriebenen Matrizen sowie für zusätzliche Erzeugnisse verfügbar. Bei Abweichung von den in unserer Arbeitsanweisung und unseren Anwendungshinweisen beschriebenen Methoden werden möglicherweise keine optimalen Ergebnisse erzielt. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

Dekontamination

Überschüssige Standardlösung vor der Entsorgung mit mindestens einem Zehntel ihres Volumens Natriumhypochlorit 5 % behandeln. Laborutensilien und kontaminierten Abfall 30 Minuten in 5%ige Natriumhypochloritlösung eintauchen, anschließend 30 Minuten lang 5%iges Aceton hinzufügen. Vor der Entsorgung mit reichlich Wasser spülen. Laborutensilien nach der Dekontamination gründlich abwaschen. Abfall verbrennen, falls es die Vorschriften erlauben.

Lagerung und Mindesthaltbarkeit

Die Säulen können ab Herstellungsdatum 18 Monate bei 2–8 °C oder 12 Monate bei 21–25 °C gelagert werden. Nicht einfrieren.

Achten Sie darauf, dass die Säule nicht ausgetrocknet ist und Puffer über dem Gel enthält. Der in der Immunoaffinitätssäule enthaltene Antikörper kann durch extreme Temperaturen oder Änderungen des pH-Werts denaturiert werden.

Probennahme

Es sollte eine repräsentative Probe durch Befolgung eines der offiziell anerkannten Probennahmeverfahren gewonnen werden. Es wird empfohlen, mindestens 1 kg der repräsentativen Probe fein zu mahlen und einen Teil (5 bis 50 g, je nach verwendeter Methode) davon zu entfernen und zu extrahieren.

Sensitivität

Die Sensitivität hängt vom endgültigen Detektionssystem ab, das vom Analytiker eingesetzt wird. Die Testsensitivität kann jedoch bei Bedarf durch Erhöhung des Volumens der Probe, die durch die Immunoaffinitätssäule geleitet wird, verbessert werden. Das Verhältnis von Lösungsmittel zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) muss beibehalten werden.

Wiederfindungen

Wenn ein Analytiker Verluste während der Extraktion berücksichtigen möchte, wird empfohlen, eine dotierte Probe desselben Produkttyps wie das getestete Material nach dem kompletten Verfahren als Referenzstandard zu analysieren. Die mit der dotierten Probe erhaltenen Wiederfindungen können verwendet werden, um die mit der Testprobe erhaltenen Ergebnisse zu korrigieren.

Säulenvorbereitung

Immunoaffinitätssäulen müssen vor der Verwendung Umgebungstemperatur haben. Kappe von der Säule abnehmen und wegwerfen. Säule fest mithilfe eines Adapters an einem Glasspritzenzylinder anbringen und in einen Immunoaffinitätssäulenständer oder einen Klemmständer platzieren.

Elution

Um das/die Toxine/e vollständig aus der Immunaффinitätssäule zu eluieren, muss das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper in der Gelsuspension in Kontakt sein. Dadurch wird sichergestellt, dass alle Bindungen zwischen dem Antikörper und dem Toxin aufgebrochen werden und so das gesamte Toxin aus der Säule freigesetzt wird, um es mit dem bevorzugten Detektionssystem zu analysieren.

Um sicherzustellen, dass das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper-Gel in Kontakt ist, kann eine der folgenden Elutionsmethoden verwendet werden: -

Rückspülung (bevorzugte Methode bei R-Biopharm): Die Rückspülung wird durchgeführt, indem der Spritzenkolben während des Durchlaufs des Lösungsmittels durch die Säule sanft angehoben und abgesenkt wird. Dadurch wird die Richtung des Eluatflusses durch das Gel umgekehrt. Dieser Prozess sollte vor der Sammlung des Eluats dreimal wiederholt werden. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.

Anwendung kleiner Lösungsmittelmengen: Fügen Sie die für die Elution erforderliche Lösungsmittelmenge in zwei oder drei kleineren Aliquoten hinzu. Belassen Sie jedes Aliquot mindestens 30 Sekunden lang mit der Gelsuspension in Kontakt, bevor Sie es zur Sammlung vollständig durch die Gelsuspension laufen lassen. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.

Inkubation mit Lösungsmittel: Fügen Sie die für die Elution erforderliche gesamte Lösungsmittelmenge hinzu und lassen Sie 2–3 Tropfen des Lösungsmittels zur Sammlung durch die Säule laufen. Belassen Sie den Rest des Lösungsmittels mindestens 60 Sekunden lang mit der Gelsuspension in Kontakt, bevor Sie es zur Sammlung durch die Gelsuspension laufen lassen. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.



Probenvorbereitung

• Getreide

Diese Methode wurde an einer Reihe von Getreide und Pseudogetreide getestet, darunter Weizen, Gerste, Mais, Quinoa, Hirse, Dinkel und Bulgurweizen.

1. Wiegen Sie 25 g gemahlene Probe und 5 g Natriumchlorid in einem lösungsmittelbeständigen Mischglas mit einem Fassungsvermögen von 1 Liter ab.
2. Fügen Sie 100 ml 80%iges Methanol hinzu und mischen Sie mit hoher Geschwindigkeit für 2 Minuten.
3. Filtrieren Sie die Probe durch Filterpapier (Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder zentrifugieren Sie für 10 Minuten bei 4.000 RPM.
4. Verdünnen Sie 4 ml des Filtrats mit 36 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).
5. Filtrieren Sie den verdünnten Extrakt durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier.
6. **HPLC:** Lassen Sie 10 ml des Filtrats (entspricht 0,25 g Probe) durchlaufen.
LC-MS/MS: Lassen Sie 20 ml verdünntes Filtrat (entspricht 0,5 g Probe) durchlaufen.
Das Filtrat sollte mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen (die Probe kann auch mittels Schwerkraft durch die Säule laufen, falls bevorzugt). Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Erfassung der Toxine durch den Antikörper unerlässlich.
7. **HPLC:** Waschen Sie die Säule mit 20 ml PBS.
LC-MS/MS: Waschen Sie die Säule mit 20 ml Wasser.
Die Säule sollte mit einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute gewaschen werden. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
8. Eluieren Sie die Toxine aus der Säule bei einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1 ml 100%igem Methanol und sammeln Sie sie in einem Braunglasgefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
9. Lassen Sie nach der Elution 1 ml Wasser durch die Säule laufen und sammeln Sie es im selben Gefäß, sodass sich ein Gesamtvolumen von 2 ml ergibt.
10. **HPLC:** Injizieren Sie 100 µl in das HPLC-System.
LC-MS/MS: Injizieren Sie 25 µl in das LC-MS/MS System.

Probenvorbereitung

• Gewürze und Trockenfrüchte

Diese Methode wurde bei einer Reihe von Gewürzen, darunter Paprika und schwarzem Pfeffer sowie Trockenfrüchten, darunter Sultaninen, Rosinen, Feigen und Aprikosen, getestet.

Hinweis: Für Paprika-Oleoresin und Kurkuma ist ein spezifischer Anwendungshinweis verfügbar.

1. Wiegen Sie 25 g gemahlene Probe und 5 g Natriumchlorid in einem lösungsmittelbeständigen Mischglas mit einem Fassungsvermögen von 1 Liter ab.
2. Fügen Sie 100 ml 80%iges Methanol hinzu und mischen Sie mit hoher Geschwindigkeit für 2 Minuten.
3. Filtrieren Sie die Probe durch Filterpapier (Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder zentrifugieren Sie für 10 Minuten bei 4.000 RPM.
4. Verdünnen Sie 4 ml des Filtrats mit 36 ml 10 % Tween 20 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).
5. Stellen Sie den pH-Wert mithilfe von 2 M Natriumhydroxid auf ca. 7,4 ein.
6. Filtrieren Sie den verdünnten Extrakt durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier.
7. Lassen Sie 10 ml des Filtrats (entspricht 0,25 g Probe) mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen (die Probe kann auch mittels Schwerkraft durch die Säule laufen, falls bevorzugt). Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Erfassung der Toxine durch den Antikörper unerlässlich.
8. **HPLC:** Waschen Sie die Säule mit 20 ml PBS.
LC-MS/MS: Waschen Sie die Säule mit 20 ml Wasser.
Die Säule sollte mit einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute gewaschen werden. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
9. Eluieren Sie die Toxine aus der Säule bei einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1 ml 100%igem Methanol und sammeln Sie sie in einem Braunglasgefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
10. Lassen Sie nach der Elution 1 ml Wasser durch die Säule laufen und sammeln Sie es im selben Gefäß, sodass sich ein Gesamtvolumen von 2 ml ergibt.
11. **HPLC:** Injizieren Sie 100 µl in das HPLC-System.
LC-MS/MS: Injizieren Sie 25 µl in das LC-MS/MS System.

Zubereitung von Standards

• Aflatoxin-Stammlösung

Es ist ratsam, mit 1.000 ng/ml Gesamt-Aflatoxin-Stammlösung zu beginnen.

Hinweis: Das Verhältnis von B1, B2, G1 und G2 kann in jedem Standard variieren. Bitte beachten Sie das korrekte Verhältnis für den gekauften Standard.

• Ochratoxin-Stammlösung

Es ist ratsam, mit 1.000 ng/ml Ochratoxin A-Lösung zu beginnen.

• Kombiniertes Arbeitsstandard

1. Messen Sie 2,5 ml 100%iges Methanol in ein Braunglasgefäß ab.
2. Schütten Sie 160 µl weg.
3. Fügen Sie 100 µl des 1.000 ng/ml Gesamt-Aflatoxin-Standards und 60 µl des 1.000 ng/ml Ochratoxin-Standards hinzu.
4. Fügen Sie 2,5 ml Wasser hinzu, sodass Sie eine kombinierte Lösung von 20 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 12 ng/ml Ochratoxin erhalten.

Kalibrierkurve

Es wird empfohlen, mindestens eine 3- bis 6-Punkt-Kalibrierkurve auszuführen. Bei Erstellung einer geeigneten Kurve sollten die Gehalte der Kalibrierstandards den Bereich der erwarteten Ergebnisse um- oder einschließen. Die verdünnten Standardlösungen sollten frisch am Tag der Analyse vorbereitet und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.

Beispiel für die Vorbereitung einer Vier-Punkt-Kalibrierkurve (kann gemäß gesetzlichen Anforderungen oder Kontaminationsgraden geändert werden):

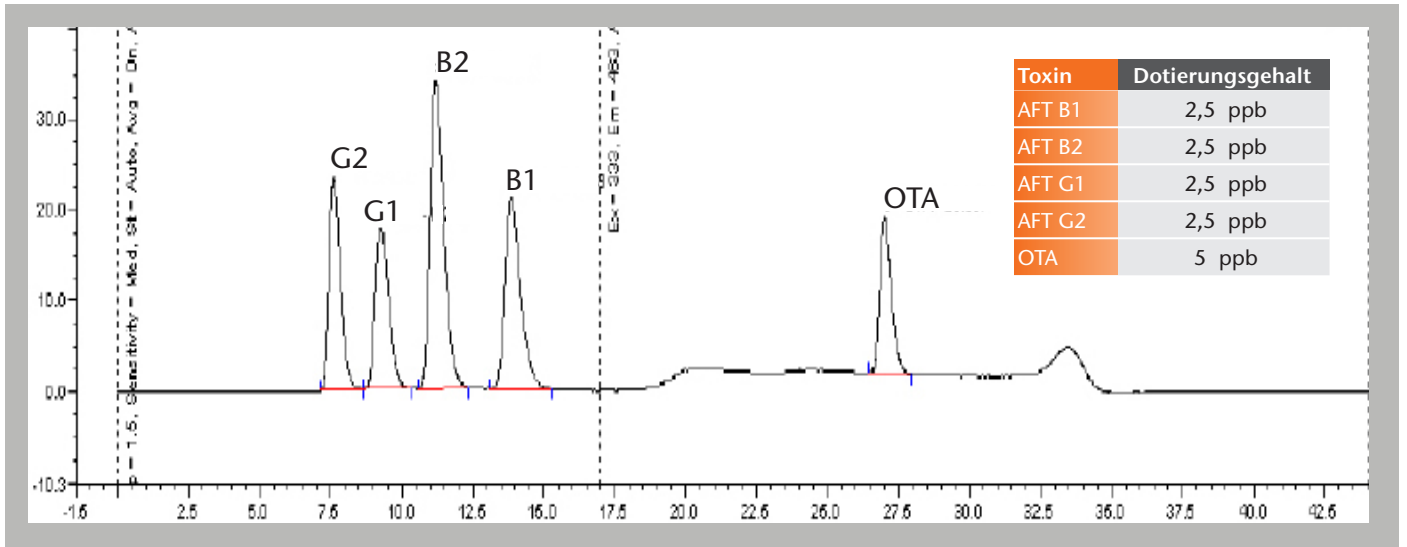
1. Standard 4: Nehmen Sie 250 µl des kombinierten Arbeitsstandards und füllen Sie mit 50%igem Methanol auf 2 ml auf (entspricht 2,5 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 1,5 ng/ml Ochratoxin A).
2. Standard 3: Nehmen Sie 1 ml Standard 4 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 1,25 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,75 ng/ml Ochratoxin A).
3. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml Standard 3 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 0,625 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,375 ng/ml Ochratoxin A).
4. Standard 1: Nehmen Sie 800 µl Standard 2 und füllen Sie mit 50%igem Methanol auf 2 ml auf (entspricht 0,25 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,15 ng/ml Ochratoxin A).
5. **HPLC:** Injizieren Sie 100 µl jeder Lösung in das HPLC-System.
Die Reihenfolge der Elution für Gesamt-Aflatoxine ist G2, G1, B2, B1 und Ochratoxin A bei Derivatisierung mit einer KOBRA® CELL.
LC-MS/MS: Injizieren Sie 25 µl jeder Lösung in das LC-MS/MS-System.

Empfohlene Bedingungen für HPLC

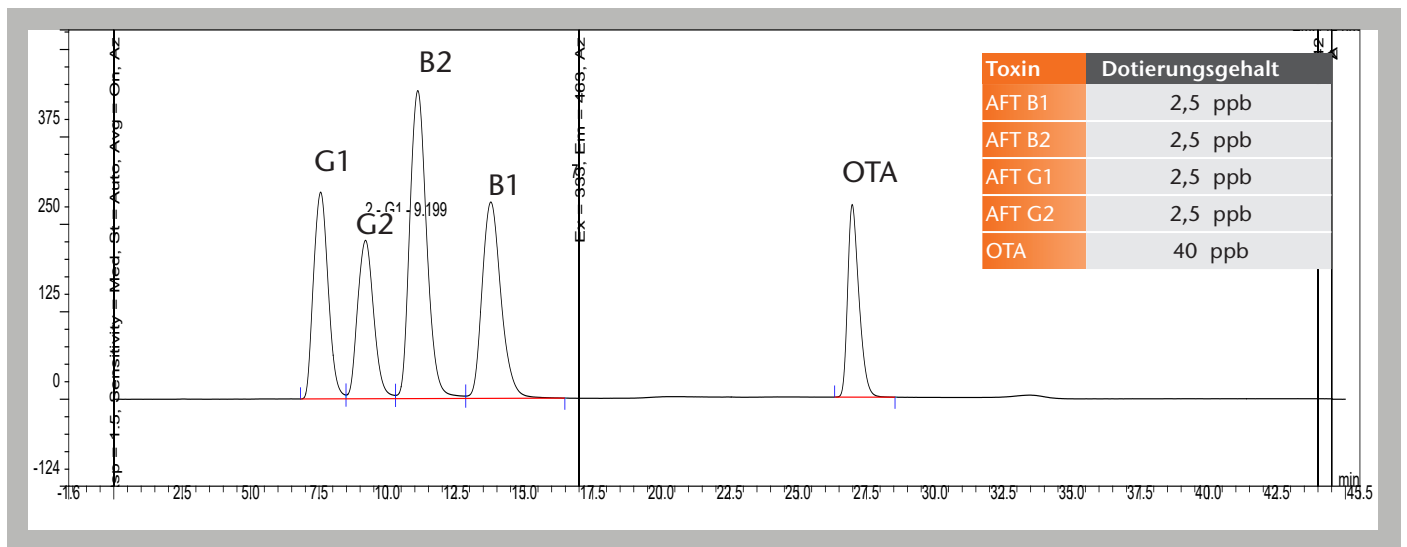
HPLC-Bedingungen			
Derivatisierung	Einstellung KOBRA® CELL bei 100 µA		
Vorläufersäulenkartusche	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm (Hichrom) oder gleichwertig		
Analysesäule	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4,6 mm x 150 mm (Hichrom) oder gleichwertig		
Mobile Phase	Mobile Phase A: Wasser : Methanol (55 : 45 v/v) Mobile Phase B: Wasser : Methanol (20 : 80 v/v) Fügen Sie 119 mg Kaliumbromid und 350 µl 4 M Salpetersäure zu 1 Liter der mobilen Phase A und B hinzu. Am Tag der Analyse frisch zubereiten.		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	100	0
	14	100	0
	16	35	65
	30	35	65
	31	100	0
	40	100	0
HPLC-Pumpe	Vom bevorzugten Lieferanten		
Flussrate	0,8 ml pro Minute		
Fluoreszenzdetektor	Zeit (min)	Anregung (nm)	Emission (nm)
	0	365	442
	17	333	463
Säulenofen	Vorläufer und Analysensäule bei 40 °C halten		
Integrator/ Datenkontrollsystem	Vom bevorzugten Lieferanten		
Injektor	Autosampler/Rheodyn-Ventil		
Injektionsvolumen	100 µl		
Reihenfolge der Elution	G2, G1, B2, B1, Ochratoxin A		

Beispiel für HPLC-Chromatogramme

- Mais**



- Paprika**



Empfohlene Bedingungen für LC-MS/MS

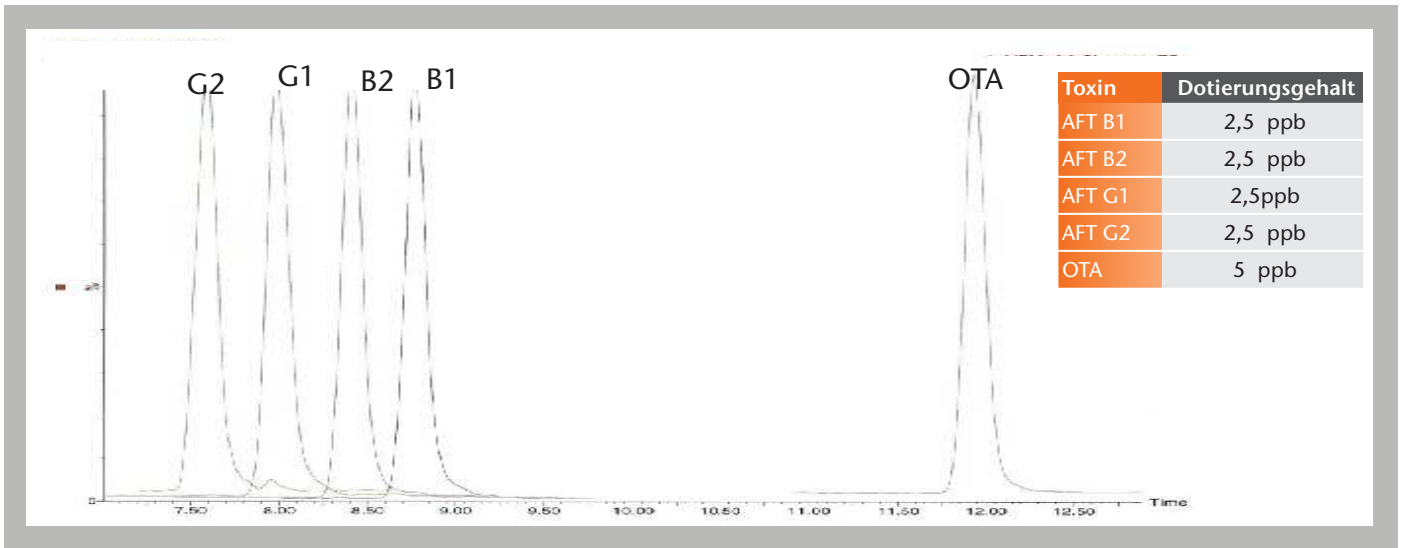
LC-Bedingungen			
Analysesäule	Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 A, 150 mm x 3 mm oder gleichwertig		
Mobile Phase	Mobile Phase A: : 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser : Methanol (95 : 5 v/v) Mobile Phase B: 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser : Methanol (2 : 98 v/v) Am Tag der Analyse frisch zubereiten.		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	80	20
	0,1	80	20
	10	10	90
	15	10	90
	15,1	80	20
	20	80	20
HPLC-Pumpe	Zur Lieferung der mobilen Phase		
Flussrate	0,3 ml pro Minute		
Säulenofen	Analysesäule bei 40 °C halten		
Integrator/ Datenkontrollsystem	Vom bevorzugten Lieferanten		
Injektor	Autosampler/Rheodyn-Ventil		
Injektionsvolumen	50 µl		

Massenspektrometriebedingungen	
Gerät	Waters® ACQUITY TQ Detektor mit Elektrospray-Ionisierung
Modus	Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus mit positiver Polarität
Kapillarspannung	+0,64 KV
Quellentemperatur	150 °C
Desolvatationsgastemperatur	350 °C
Desolvatationsgasfluss	800 L/h (N)
Flussrate des Conegases	50 L/h (N)

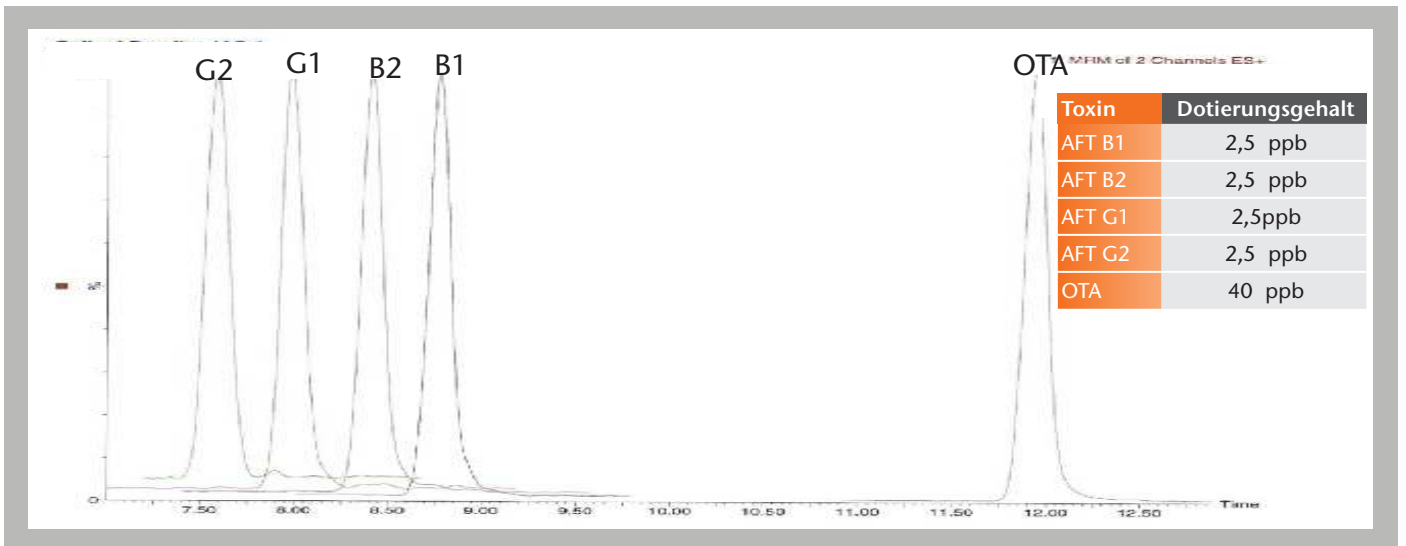
Geräteeinstellung						
Toxin	Zeits- egment (min)	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ionen (m/z)	Verweilzeit (s)	Konusspan- nung (V)	Kollisions- spannung (eV)
AFT G2	7,81	330,9 [M+H] ⁺	245,13 (Quantifizierer)	0,102	54	32
			189,07 (Qualifizierer)		54	42
AFT G1	8,21	328,9 [M+H] ⁺	243,06 (Quantifizierer)	0,102	52	28
			199,88 (Qualifizierer)		52	42
AFT B2	8,66	314,9 [M+H] ⁺	281,12 (Quantifizierer)	0,102	58	26
			259,15 (Qualifizierer)		58	30
AFT B1	9,02	312,9 [M+H] ⁺	284,93 (Quantifizierer)	0,102	50	22
			241,10 (Qualifizierer)		50	36
OTA	12,03	403,9 [M+H] ⁺	239,0 (Quantifizierer)	0,428	32	22
			358,1 (Qualifizierer)		32	14

Beispiel für LC-MS/MS Chromatogramme

- Mais



- Paprika



Qualität

Die Produkte von RBR werden unter einem nach ISO 9001 zertifizierten Qualitätsmanagementsystem entwickelt, gefertigt, getestet und geliefert. Dies garantiert ein konsistentes Produkt, das stets Ihren Leistungsanforderungen entspricht. Unsere Produkte wurden in mehreren Ringversuchen zur Entwicklung europäischer und internationaler Standardmethoden verwendet und finden in wichtigen Einrichtungen, Lebensmittelunternehmen und staatlichen Labors Anwendung. Kundenreferenzen für Produkte von RBR sind auf Anfrage erhältlich.

Technischer Support

RBR weiß, dass Benutzer unserer Produkte von Zeit zu Zeit Unterstützung oder Rat benötigen. Daher bieten wir unseren Kunden die folgenden Serviceleistungen:

- Analyse von Problemproben.
- Anwendungshinweise für schwierige Proben.
- Literatur aus der RBR-Bibliothek.
- Installation und Support der KOBRA® CELL.
- Rat zu Detektionsparametern.
- Rat zur Vorbereitung und Handhabung von Standards.
- Neueste Informationen zu Gesetzgebung, Probennahme und andere Neuigkeiten per E-Mail.
- Bereitstellung von dotierten Proben.

Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

Garantie

R-Biopharm Rhône Ltd übernimmt keinerlei Gewähr, ob ausdrücklich oder stillschweigend, außer dass alle von R-Biopharm Rhône Ltd hergestellten Produkte aus Materialien geeigneter Qualität bestehen. Sollten irgendwelche Materialien einen Defekt aufweisen, liefert R-Biopharm Rhône Ltd ein Ersatzprodukt. Der Benutzer übernimmt alle Risiken und sämtliche Haftung, die sich aus der Verwendung von Produkten und Verfahren von R-Biopharm Rhône Ltd ergeben. R-Biopharm Rhône Ltd übernimmt keine Haftung für Schäden, einschließlich besonderer und Folgeschäden, Verlust oder Kosten, die sich direkt oder indirekt aus der Verwendung von Produkten und Verfahren von R-Biopharm Rhône Ltd ergeben.

R-Biopharm Rhône Ltd
Block 10 Todd Campus
West of Scotland Science Park
Acre Road, Glasgow G20 0XA
www.r-biopharm.com