

AFLAPREP[®]

Product Code: DP07 / P07

Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC or LC-MS/MS.
For in vitro use only.

P07/V25/30.06.21

www.r-biopharm.com



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Contents

	Page
Test Principle.....	4
Reagents Not Provided.....	4
Accessory Products.....	4
Hazards.....	4
Recommended Methods and Application Notes.....	4
Decontamination.....	5
Storage & Shelf Life.....	5
Sampling.....	5
Sensitivity.....	5
Recoveries.....	5
Column Preparation.....	5
Elution.....	6
Sample Preparation.....	7
• Cereal.....	7
• Nuts.....	8
Preparation of Standards.....	8
Calibration Curve.....	9
HPLC Information.....	10
Example HPLC Chromatogram for Maize (Spiked at 10 ppb Total Aflatoxin).....	11
Example HPLC Chromatogram for Peanuts (Spiked at 10 ppb Total Aflatoxin).....	11
Quality.....	12
Technical Support.....	12
Warranty.....	12

Test Principle

The procedure is based on monoclonal antibody technology, which makes the test highly specific, sensitive, rapid and simple to perform.

The columns contain a gel suspension of monoclonal antibody specific to the toxins of interest. Following extraction of the toxins the sample extract is filtered, diluted and passed slowly through the immunoaffinity column. Any toxins which are present in the sample are retained by the antibody within the gel suspension. The column is washed to remove unbound material and the toxins are then released from the column following elution with solvent. The eluate is collected prior to analysis by HPLC or LC-MS/MS. Aflatoxins are required to be derivatised when analysed by HPLC.

The total extraction and clean-up time takes approximately 20 minutes to perform. The result is improved clean-up and concentration of the toxins from food and feed samples giving a much cleaner chromatogram and therefore providing more accurate and sensitive detection. The columns also have the added advantage that they can be automated for large scale analysis of samples.

Reagents Not Provided

- Distilled / Deionised Water (suitable for use with HPLC, e.g. MilliQ)
- Solvents (HPLC Grade Methanol)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (RP202)*
- Aflatoxin Standard (Please refer to Preparation of Standards section)
- Sodium Chloride
- Sodium Hydroxide (to pH filtrate if required)
- Nitric Acid (only required when derivatising with a KOBRA® CELL)
- Potassium Bromide (only required when derivatising with a KOBRA® CELL)

Accessory Products

- Whatman No. 113 or No. 4 Filter Paper
- KOBRA® CELL (K01)*
- Immunoaffinity Column Rack (CR1)*
- Immunoaffinity Column Accessory Pack (AP01)*

* Available from R-Biopharm. Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Hazards

Mycotoxins are very hazardous substances. Only laboratories equipped to handle toxic materials and solvents should perform analyses. Suitable protective clothing, including gloves, safety glasses and lab coats should be worn throughout the analysis.

Flammable solvents should be stored in an explosion-proof cabinet. Use a chemical hood and protective equipment as applicable.

Contact your local R-Biopharm distributor for a Material Safety Data Sheet for further information if required.

Recommended Methods and Application Notes

Methods are available for all matrices covered by legislation as well as additional commodities. Deviation from the methods described in our Instructions For Use and Application Notes may not achieve optimum results. Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Decontamination

Prior to disposal, excess standard solutions should be treated with at least one-tenth their volume of 5 % sodium hypochlorite. Labware and contaminated waste should be immersed in 5 % sodium hypochlorite solution for 30 minutes followed by the addition of 5 % acetone for 30 minutes. Flush with copious amounts of water before disposal. After decontamination labware should be thoroughly washed. Incinerate waste if regulations permit.

Storage & Shelf Life

The columns expire 18 months from date of manufacture if stored at 2 - 8 °C or 12 months from date of manufacture if stored at 21 - 25 °C. Do not freeze.

Ensure the column has not dried out and contains buffer above the gel. It is important to note the antibody included in the immunoaffinity column can be denatured by extreme temperature or pH change.

Sampling

A representative sample should be obtained by following one of the officially recognised sampling procedures. It is recommended that a minimum of 1 kg of representative sample is finely ground and a portion (5 - 50 g dependent on method used) of this is removed and extracted.

Sensitivity

The sensitivity is dependent on the final detection system employed by the analyst. However the test sensitivity may be improved if required by increasing the volume of sample passed through the immunoaffinity column. Please note the ratio of solvent to phosphate buffered saline (PBS) should be maintained.

Recoveries

If an analyst wishes to account for losses during extraction it is recommended a spiked sample of the same commodity type as the material being tested is analysed following the complete procedure as a reference standard. The recoveries obtained with the spiked sample can be used to correct the results obtained with the test sample.

Column Preparation

Immunoaffinity columns should be at ambient temperature before use. Remove the cap from the top of the column and discard. Firmly attach the column to a glass syringe barrel using an adapter and place in an immunoaffinity column rack or clamp stand.

Elution

In order to fully elute the toxin/s from the immunoaffinity column it is vital that the solvent is in contact with the antibody within the gel suspension for a sufficient period of time. This ensures that all of the bonds between the antibody and the toxin are broken, ultimately releasing all of the toxin from the column for analysis with the detection system of choice

To ensure that the solvent is in contact with the antibody gel for a sufficient period of time any of the following elution methods can be used: -

Backflushing (this is the preferred method of choice at R-Biopharm): backflush by gently raising and lowering the syringe plunger during passage of the solvent through the column. This process will reverse the direction of flow of the eluate through the gel. This should be repeated 3 times before collecting the eluate. Proceed to the next step in the method.

Application of small volumes of solvent: apply the volume of solvent required for elution in two or three smaller aliquots. Allow each aliquot to remain in contact with the gel suspension for a minimum of 30 seconds before allowing each to pass fully through the gel suspension for collection. Proceed to the next step in the method.

Incubation with solvent: apply the full volume of solvent required for elution and allow 2-3 drops of the solvent to pass through the column for collection. Allow the remainder of the solvent to remain in contact with the gel suspension for a minimum of 60 seconds before allowing it to pass through the gel suspension for collection. Proceed to the next step in the method.



Sample Preparation

• Cereal

This method has been tested on a number of cereals including wheat, barley and maize.

1. Weigh 50 g of ground sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 100 ml of 80 % methanol and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the sample through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Dilute 2 ml of filtrate with 14 ml of phosphate buffered saline (PBS).
5. Pass the filtrate (equivalent to 1 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxins by the antibody.
6. Wash the column by passing 20 ml of PBS through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
7. Elute the toxins from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1 ml of 100 % methanol and collect in an amber glass vial. Please refer to the Elution section for further information.
8. Following elution pass 1 ml of water through the column and collect in the same vial to give a 2 ml total volume.
9. Inject 100 μ l onto the HPLC system.

Sample Preparation

• Nuts

This method has been tested on a number of nuts including pistachio nuts, peanuts, almonds, Brazil nuts and walnuts.

1. Weigh 50 g of ground sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 100 ml of water and blend at high speed for 1 minute.
3. Add 150 ml of 100 % methanol and blend again for 2 minutes.
4. Filter the sample through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
5. Adjust to around pH 7.4 using 2 M sodium hydroxide.
6. Dilute 5 ml of filtrate with 5 ml of phosphate buffered saline (PBS) solution.
7. Pass the diluted filtrate (equivalent to 1 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxins by the antibody.
8. Wash the column by passing 20 ml of PBS through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
9. Elute the toxins from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1 ml of 100 % methanol and collect in an amber glass vial. Please refer to the Elution section for further information.
10. Following elution pass 1 ml of water through the column and collect in the same vial to give a 2 ml total volume.
11. Inject 100 μ l onto the HPLC system.

Preparation of Standards

Preparation of 1,000 ng/ml aflatoxin B1, B2, G1 and G2 stock solution:

1. Ready-to-use AFLASTANDARD (P22 / P22A, 1,000 ng/ml) is available from R-Biopharm.

or

1. Alternatively, crystalline powder of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 can be purchased. Contact your local R-Biopharm distributor for further information. The powder is reconstituted as per the instructions provided and left overnight in the dark at room temperature to give a stock concentrate.
2. This is then used to prepare a 1,000 ng/ml aflatoxin B1, B2, G1 and G2 stock solution.

Note: The ratio of B1, B2, G1 and G2 may vary in each standard. Please note the correct ratio for the standard purchased.

Calibration Curve

It is recommended to run at least a 3 - 6 point calibration curve. In constructing a suitable curve the levels of the calibration standards should bracket or include the range of expected results. The diluted standard solutions should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

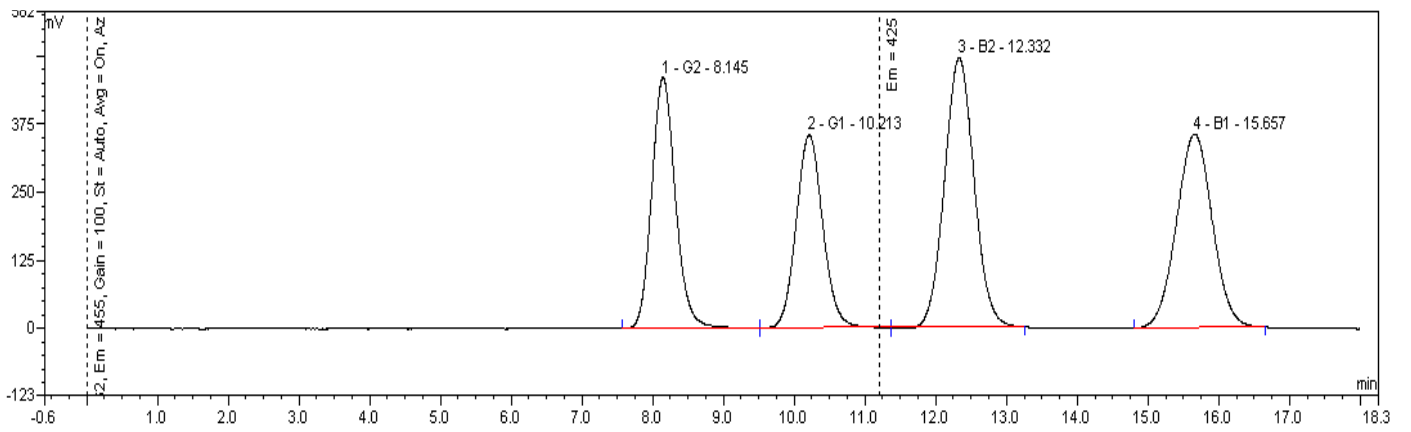
Example of how to prepare a four point calibration curve (can be modified according to legislative requirements or contamination levels):

1. Standard 4: Take 80 μ l of 1,000 ng/ml total aflatoxin solution and make up to 2 ml with 50 % methanol (equivalent to 40 ng/ml).
2. Standard 3: Take 1 ml of 40 ng/ml and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 20 ng/ml).
3. Standard 2: Take 1 ml of 20 ng/ml and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 10 ng/ml).
4. Standard 1: Take 400 μ l of 10 ng/ml and make up to 2 ml with 50 % methanol (equivalent to 2 ng/ml).
5. Inject 100 μ l of each standard onto the HPLC system. The elution order is G2, G1, B2 and B1 when derivatising with a KOBRA[®] CELL.

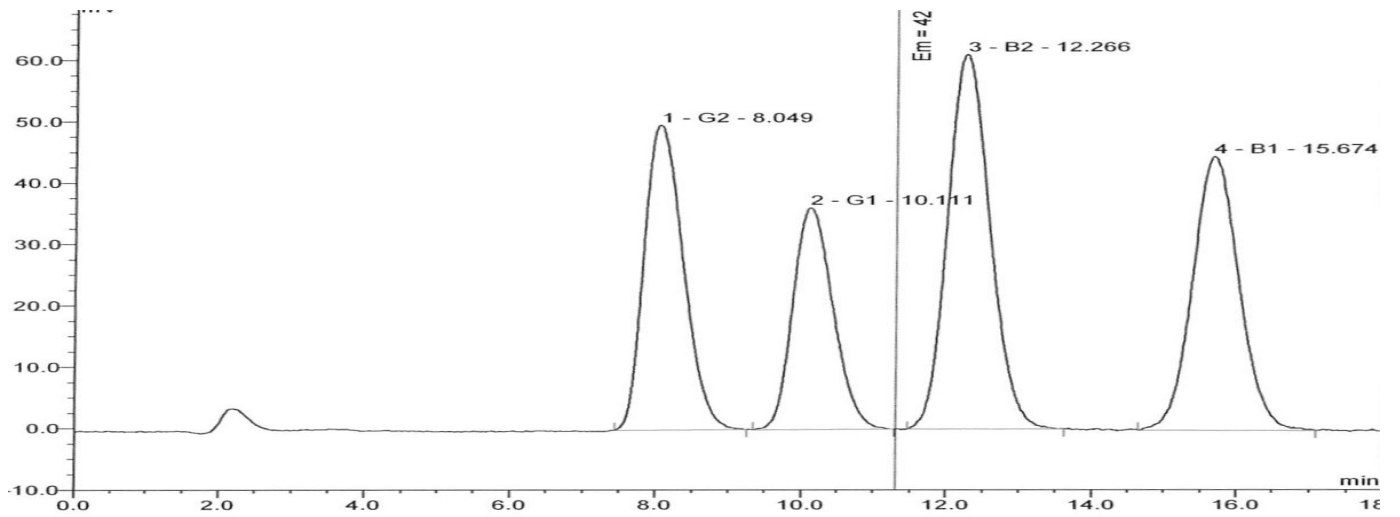
Recommended HPLC Conditions

HPLC Conditions	
Derivatisation	KOBRA® CELL at 100 µA setting
Guard Cartridge	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm (Hichrom) or equivalent
Analytical Column	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) or equivalent
Mobile Phase	Water : Methanol (60 : 40 v/v)
HPLC Pump	To deliver mobile phase Add 119 mg of potassium bromide and 350 µl 4 M Nitric Acid to 1 litre of mobile phase. Prepare fresh on day of analysis.
Flow Rate	1.0 ml/minute
Fluorescence Detector	Excitation: 362 nm Emission: 425 nm (B1 and B2) 455 nm (G1 and G2)
Column Heater	Maintain guard and analytical columns at 40 °C
Integrator / Data Control System	From preferred supplier
Injector	Autosampler / Rheodyne valve
Injection Volume	100 µl
Elution Order	G2, G1, B2, B1

Example HPLC Chromatogram for Maize (Spiked at 10 ppb Total Aflatoxin)



Example HPLC Chromatogram for Peanuts (Spiked at 10 ppb Total Aflatoxin)



Quality

RBR products are developed, manufactured, tested and dispatched under an ISO 9001 registered Quality Management System, guaranteeing a consistent product, which always meets our performance specifications. Our products have been used in many collaborative studies to develop standard European and International Methods and are widely used by key institutions, food companies and government laboratories. Customer references for RBR products are available on request.

Technical Support

RBR understand that from time to time users of our products may need assistance or advice. Therefore, we are pleased to offer the following services to our customers:

- Analysis of problem samples.
- Application notes for difficult samples.
- References from the RBR library.
- Installation and support of the KOBRA® CELL.
- Advice on detection parameters.
- Advice on preparation and handling of standards.
- Updates on legislation, sampling and other news by e-mail.
- Provision of spiked samples.

Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Warranty

R-Biopharm Rhône Ltd makes no warranty of any kind, express or implied, except that all products made by R-Biopharm Rhône Ltd are made with materials of suitable quality. If any materials are defective, R-Biopharm Rhône Ltd will provide a replacement product. The user assumes all risk and liability resulting from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products and procedures. R-Biopharm Rhône Ltd shall not be liable for any damages, including special or consequential damages, loss or expense arising directly or indirectly from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products or procedures.

AFLAPREP®

Art. Nr.: RBRP07

Immunaффinitätssäulen zur Verwendung in Kombination mit HPLC oder LC-MS/MS.
Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Inhalt

	Seite
Testprinzip	14
Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien	14
Zubehörprodukte.....	14
Gefahren	14
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise	14
Dekontamination	15
Lagerung und Haltbarkeit	15
Probennahme	15
Sensitivität	15
Wiederfindung.....	15
Säulenvorbereitung.....	15
Elution	16
Verfügbare Applikationen	16
Probenvorbereitung	17
• Getreide	17
• Nüsse	18
Vorbereitung von Standards.....	19
Kalibrierkurve.....	19
Empfohlene HPLC-Bedingungen	20
Typische HPLC-Chromatogramme zur Analyse von Aflatoxinen mittels AFLAPREP®	
Immunaффinitätssäulen.....	21
• Getreide	21
• Nüsse	21
Qualität.....	22
Technische Unterstützung.....	22
Garantie	22

Testprinzip

Das Verfahren basiert auf monoklonaler Antikörpertechnologie, die den Test hochspezifisch, sensitiv, schnell und einfach durchführbar macht.

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch für die jeweiligen Toxine ist. Im Anschluss an die Extraktion der Toxine wird der Probenextrakt filtriert, verdünnt und langsam durch die Immunaффinitätssäule geleitet. Die in der Probe vorhandenen Toxine werden von den Antikörper in der Gelsuspension gebunden. Die Säule wird gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen, und die Toxine werden mit einem geeigneten Lösungsmittel von der Säule eluiert. Das Eluat wird vor der HPLC oder LC-MS/MS-Analyse gesammelt und derivatisiert. Aflatoxine müssen vorher derivatisiert werden, wenn sie per HPLC analysiert werden.

Die Extraktion und Reinigung dauert insgesamt ca. 20 Minuten. Das Ergebnis ist eine verbesserte Reinigung und Konzentration der Toxine aus Lebensmittel- und Futtermittel, wodurch man ein verbessertes Chromatogramm und somit eine genauere und sensitivere Detektion erhält. Die Säulen haben außerdem den Vorteil, dass sie für eine große Anzahl von Proben automatisiert werden können.

Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

- Destilliertes / deionisiertes Wasser (geeignet für die HPLC, z. B. MilliQ)
- Lösungsmittel (Methanol HPLC-Qualität)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (RBRRP202) *
- Aflatoxin-Standard (siehe Abschnitt „Vorbereitung von Standards“)
- Natriumchlorid
- Natriumhydroxid (zur pH-Einstellung, falls erforderlich)
- Salpetersäure (nur erforderlich, wenn mit einer KOBRA[®] CELL derivatisiert wird)
- Kaliumbromid (nur erforderlich, wenn mit einer KOBRA[®] CELL derivatisiert wird)

Zubehörprodukte

- Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier
 - KOBRA[®] CELL (RBRK01)*
 - Immunaффinitätssäulenständer (RBRCR1)*
 - Immunaффinitätssäulen-Zubehörpaket (RBRAP01)*
- * Erhältlich bei R-Biopharm AG.

Gefahren

Mykotoxine sind sehr gefährliche Stoffe. Analysen sollten nur von Laboren durchgeführt werden, die über die entsprechende Ausrüstung zur Handhabung toxischer Substanzen und Lösungsmittel verfügen. Während der Analyse ist geeignete Schutzkleidung einschließlich Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel zu tragen.

Entzündliche Lösungsmittel müssen in einem explosions sicheren Schrank aufbewahrt werden. Je nach Anwendung ist eine Abdeckhaube und Schutzausrüstung zu verwenden.

Bitte wenden Sie sich an die R-Biopharm AG, wenn Sie ein Sicherheitsdatenblatt erhalten möchten.

Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise

Es sind Methoden für alle gesetzlich vorgeschriebenen Matrizen sowie für zusätzliche Erzeugnisse verfügbar. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

Dekontamination

Überschüssige Standardlösungen müssen vor der Entsorgung mit mindestens einem Zehntel ihres Volumens mit einer 5 %igen Natriumhypochloritlösung behandelt werden. Laborzubehör und kontaminierter Abfall sollte 30 Minuten lang in eine 5 % Natriumhypochloritlösung eingetaucht werden, gefolgt von der Zugabe einer 5 % Acetonlösung für 30 Minuten. Vor der Entsorgung mit unbedingt mit reichlich Wasser nachspülen. Laborzubehör sollte nach einer Dekontamination gründlich gewaschen werden. Abfall verbrennen, wenn die Vorschriften es zulassen.

Lagerung und Haltbarkeit

Die Säulen haben eine Mindesthaltbarkeit von 18 Monaten ab dem Herstellungsdatum, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden, bzw. von 15 Monaten ab dem Herstellungsdatum, wenn sie bei 21 - 25 °C gelagert werden. Die Säulen nicht einfrieren.

Es sollte sichergestellt werden, dass die Säulen nicht austrocknen und sich Puffer über dem Gel befindet. Wichtiger Hinweis! Der Antikörper in der Immunaффinitätssäule kann durch extreme Temperatur- oder pH-Änderungen denaturiert werden.

Probennahme

Eine repräsentative Probe sollte durch Befolgung einer der offiziell anerkannten Probennahmeverfahren entnommen werden. Es wird empfohlen, dass mindestens 1 kg einer repräsentativen Probe fein gemahlen und ein Teil (10 - 50 g abhängig von der verwendeten Methode) hiervon abgenommen und extrahiert wird.

Sensitivität

Die Sensitivität ist abhängig vom verwendeten Detektionssystem, das zur Analyse verwendet wird. Die Testsensitivität kann bei Bedarf verbessert werden, indem das Volumen der durch die Immunaффinitätssäule geleiteten Probe erhöht wird.

Wiederfindung

Wenn ein Sie Verluste während der Extraktion berücksichtigen wollen, wird empfohlen, dass eine gespikete Probe der gleichen Matrix wie die zu analysierende Probe gemäß dem kompletten Verfahren wie ein Referenzstandard analysiert wird. Die mit der gespikten Probe erhaltene Wiederfindung kann dann verwendet werden, um die mit der Testprobe erhaltenen Ergebnisse zu korrigieren.

Säulenvorbereitung

Die Immunaффinitätssäulen sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Eine Lücke zwischen dem Gel und der Fritte ist normal und ist keine Beeinträchtigung der Funktionalität. Gelegentlich kann sich hier während des Transports eine Blase bilden. Falls dies passiert, kann die Blase durch leichtes Klopfen der Säule mit der Unterseite gegen eine harte Oberfläche entfernt werden.

Entfernen Sie die Kappe von der Oberseite der Säule und werfen Sie sie weg. Die Säule fest an einem Glasspritzenzylinder anbringen und in einen Immunaффinitätssäulen- oder einen Klemmständer stellen.

Elution

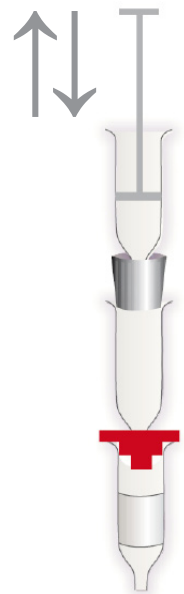
Um das/die Toxine/e vollständig aus der Immunaффinitätssäule zu eluieren, muss das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper in der Gelsuspension in Kontakt sein. Dadurch wird sichergestellt, dass alle Bindungen zwischen dem Antikörper und dem Toxin aufgebrochen werden und so das gesamte Toxin aus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



Vorbereitung der Probe

• Getreide

Diese Methode wurde mit verschiedenen Getreidesorten, darunter Weizen, Gerste und Mais, getestet.

1. 50 g gemahlene Probe und 5 g Natriumchlorid in einen lösungsmittelresistenten Mixer mit einer Kapazität von 1 Liter einwiegen.
2. 100 ml 80 % Methanol dazugeben und 2 min mit höchster Geschwindigkeit mischen.
3. Die Probe filtrieren (z. B. mit Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier) oder bei 4.000 U/min 10 Min lang zentrifugieren.
4. 2 ml des Filtrats mit 14 ml der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) verdünnen.
5. Das verdünnte Filtrat (äquivalent zu 1 g der Probe) mit einer Flussrate von 2 ml/min durch die Säule laufen lassen (oder die Probe durch Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, wenn dies bevorzugt wird). Eine langsame, stetige Flussrate ist wichtig, damit das Toxin vom Antikörper gebunden wird.
6. Die Säule mit 20 ml der PBS-Puffer und einer Flussrate von etwa 5 ml/min waschen. Luft durch die Säule drücken, um die Restflüssigkeit zu entfernen.
7. Die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen/Sek mittels 1 ml 100 % Methanol eluieren und in einem Braunglasröhrchen auffangen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
8. Nach der Elutiojn 1 ml Wasser durch die Säule laufen lassen und im gleichen Röhrchen auffangen, um ein Volumen von insgesamt 2 ml zu erhalten.
9. 100 µl des Eluats in das HPLC-System injizieren.

Vorbereitung der Probe

• Nüsse

Diese Methode wurde an verschiedenen Nüssen, darunter Pistazien, Erdnüsse, Mandeln, Paranüsse und Walnüsse, getestet.

1. 50 g gemahlene Probe und 5 g Natriumchlorid in einen lösungsmittelresistenten Mixer mit einer Kapazität von 1 Liter einwiegen.
2. 100 ml Wasser zugeben und die Probe 1 min lang mit höchster Geschwindigkeit mischen.
3. 150 ml 100 % Methanol zugeben und erneut 2 min lang mit höchster Geschwindigkeit mischen.
4. Die Probe filtrieren (z. B. Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier) oder bei 4.000 U/min 10 min lang zentrifugieren.
5. Mit 2 M Natriumhydroxid- Lösung auf einen pH-Wert von ca. 7,4 einstellen.
6. 5 ml des Filtrats mit 5 ml der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) verdünnen.
7. Das verdünnte Filtrat (äquivalent zu 1 g der Probe) mit einer Flussrate von 2 ml/min durch die Säule laufen lassen (oder die Probe durch Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, wenn dies bevorzugt wird). Eine langsame, stetige Flussrate ist wichtig, damit das Toxin vom Antikörper gebunden wird.
8. Die Säule mit 20 ml PBS-Puffer und einer Flussrate von etwa 5 ml/min waschen. Luft durch die Säule drücken, um die Restflüssigkeit zu entfernen.
9. Die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen/Sek mittels 1 ml 100 % Methanol eluieren und in einem Braunglasröhrchen auffangen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
10. Nach der Elution 1 ml Wasser durch die Säule laufen lassen und im gleichen Röhrchen auffangen, um ein Volumen von insgesamt 2 ml zu erhalten.
11. 100 µl des Eluats in das HPLC-System injizieren.

Vorbereitung von Standards

Vorbereitung von 1.000 ng/ml Aflatoxin-Standardlösungen:

1. Eine gebrauchsfertige AFLASTANDARD (RBRP22 / RBRP22A, 1.000 ng/ml) ist bei R-Biopharm AG erhältlich.
oder
1. Alternativ können kristalline Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 in Pulverform erworben werden. Bitte wenden Sie sich an R-Biopharm AG, wenn Sie weitere Informationen erhalten möchten. Das Pulver wird entsprechend den mitgelieferten Anweisungen rekonstituiert und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen, um ein Stammkonzentrat zu erhalten.
2. Dieses wird dann verwendet, um eine 1.000 ng/ml Gesamt-Aflatoxin-Standardlösung vorzubereiten.

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

Kalibrierkurve

Es wird empfohlen, mindestens eine 3 bis 5-Punkt-Kalibrierkurve zu erstellen. Bei der Erstellung einer geeigneten Kurve sollten die Werte der Kalibrierstandards den Bereich oder Abschnitte der erwarteten Ergebnisse umfassen. Die verdünnten Standardlösungen sollten am Tag des Einsatzes frisch vorbereitet und innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden verwendet werden.

Vorbereitung einer 4-Punkt-Kalibrierkurve:

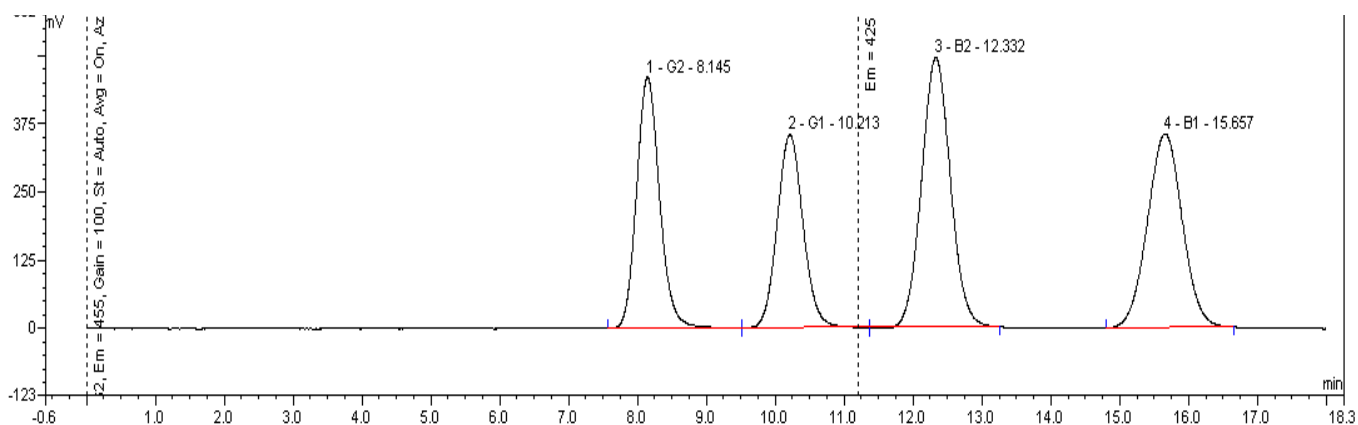
1. Standard 4: 80 µl von der 1.000 ng/ml Gesamt-Aflatoxin-Lösung nehmen und bis auf 2 ml mit 50 % Methanol auffüllen (äquivalent zu 40 ng/ml).
2. Standard 3: 1 ml von der 40 ng/ml entnehmen und 1 ml 50 % Methanol zugeben (äquivalent zu 20 ng/ml).
3. Standard 2: 1 ml von der 20 ng/ml entnehmen und 1 ml 50 % Methanol zugeben (äquivalent zu 10 ng/ml).
4. Standard 1: 400 µl von der 10 ng/ml entnehmen und bis auf 2 ml mit 50 % Methanol auffüllen (äquivalent zu 2 ng/ml).
5. 100 µl jeder Lösung in das HPLC-System injizieren. Die Elutionsreihenfolge ist G2, G1, B2 und B1, wenn mit einer KOBRA® CELL derivatisiert wird.

Empfohlene HPLC-Bedingungen

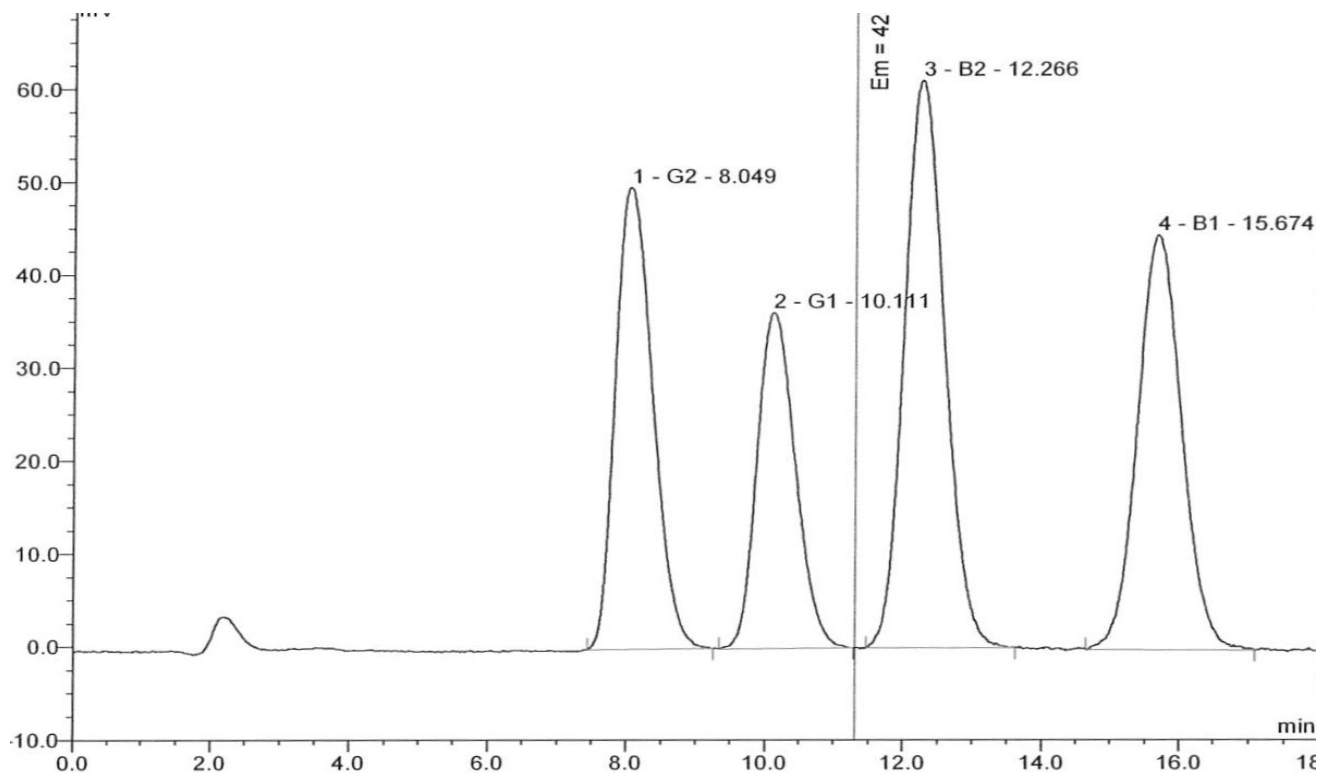
HPLC-Bedingungen	
Derivatisierung	KOBRA® CELL bei 100 µA einstellen
Vorsäule	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm (Hichrom) oder Äquivalent
Analytische Säule	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) oder Äquivalent
Mobile Phase	Wasser : Methanol (60 : 40 v/v)
HPLC-Pumpe	Für mobile Phase 119 mg Kaliumbromid und 350 µl 4 M Salpetersäure zu 1 Liter mobiler Phase zugeben. Täglich frisch ansetzen.
Flussrate	1,0 ml/Minute
Fluoreszenzdetektor	Erregung: 362 nm
	Emission: 425 nm (B1 und B2) 455 nm (G1 und G2)
Säulenheizung	Hält die Vor- und die Analytische Säule bei 40 °C
Integrator/ Datenkontrollsystem	Von bevorzugtem Anbieter
Injektor	Autosampler / Rheodyne-Ventil
Injektionsvolumen	100 µl
Elutionsreihenfolge	G2, G1, B2, B1

Typische HPLC-Chromatogramme zur Analyse von Aflatoxinen mittels AFLAPREP® Immunaффinitätssäulen

• Getreide



• Nüsse



Qualität

RBR-Produkte werden unter einem ISO 9001- registrierten Qualitätsmanagementsystem entwickelt, hergestellt, getestet und ausgeliefert, wodurch ein konsistentes Produkt gewährleistet wird, das stets unsere Leistungsspezifikationen erfüllt. Unsere Produkte wurden in vielen kollaborativen Studien eingesetzt, um europäische und internationale Standardmethoden zu entwickeln, und werden von vielen Schlüsselinstitutionen, Lebensmittelunternehmen und staatlichen Laboren verwendet. Kundenreferenzen für RBR-Produkte sind auf Anfrage erhältlich.

Technische Unterstützung

RBR versteht, dass Benutzer unserer Produkte von Zeit zu Zeit Hilfe oder Beratung benötigen. Wir freuen uns daher, unseren Kunden die folgenden Serviceleistungen anbieten zu können:

- Analyse problematischer Proben.
- Anwendungshinweise für schwierige Proben.
- Referenzen aus der RBR-Bibliothek.
- Installation und Unterstützung der KOBRA® CELL.
- Beratung zu Detektionsparametern.
- Beratung zur Vorbereitung und Handhabung von Standards.
- Aktuelle Informationen zur Gesetzgebung, Probenentnahme und andere Neuigkeiten per E-Mail.
- Bereitstellung gespikter Proben.

Bitte wenden Sie sich an R-Biopharm AG, wenn Sie weitere Informationen erhalten möchten.

Garantie

R-Biopharm Rhône Ltd gibt keine Garantie gleich welcher Art, weder ausdrücklich noch stillschweigend, mit Ausnahme der, dass alle von R-Biopharm Rhône Ltd hergestellten Produkte mit Materialien von geeigneter Qualität hergestellt sind. Sollten Materialien fehlerhaft sein, stellt R-Biopharm Rhône Ltd ein Ersatzprodukt bereit. Der Benutzer übernimmt sämtliche Risiken und Haftung, die sich aus der Verwendung von R-Biopharm Rhône Ltd-Produkten und Verfahren ergeben. R-Biopharm Rhône Ltd haftet für keinerlei Schäden, einschließlich spezieller oder Folgeschäden, Verlust oder Kosten, die direkt oder indirekt aus der Verwendung von R-Biopharm Rhône Ltd-Produkten oder Verfahren entstehen.

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