

# FUMONIPREP<sup>®</sup>

Product Code: DP31 / P31B

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

P31/V18/30.06.21

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



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**



# Contents

	Page
Test Principle.....	4
Reagents Not Provided.....	4
Accessory Products.....	4
Recommended Methods and Application Notes.....	4
Hazards.....	5
Decontamination.....	5
Storage & Shelf Life.....	5
Sampling.....	5
Sensitivity.....	5
Recoveries.....	5
Column Preparation.....	6
Elution.....	6
HPLC Information.....	7
• Preparation of 0.1 M Borate Buffer.....	7
• Preparation of OPA Reagent (with Mercaptoethanol or 1-Thioglycerol).....	7
• Programming the Autosampler.....	7
• Sample Preparation - Cereal.....	8
• Preparation of Standards.....	9
• Calibration Curve.....	9
• Recommended HPLC Conditions.....	10
• Example HPLC Chromatogram for Maize (Spiked at 1,000 ppb for FB1 and 500 ppb for FB2).....	10
LC-MS/MS Information.....	10
• Sample Preparation - Cereal.....	11
• Preparation of Standards.....	12
• Calibration Curve.....	12
• Recommended LC-MS/MS Conditions.....	13
• Example LC-MS/MS Total Ion Count Chromatogram for Maize (Spiked at 1,000 ppb for FB1 and 280 ppb for FB2).....	13
Quality.....	15
Technical Support.....	15
Warranty.....	15

## 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. Fumonisin is required to be derivatised when analysed by HPLC.

The total extraction and clean-up time takes approximately 30 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

For HPLC and LC-MS/MS Methods:

- Distilled / Deionised Water (suitable for use with HPLC, e.g. MilliQ)
- Solvents (HPLC Grade Methanol and Acetonitrile)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (RP202)\*
- Fumonisin B1 and B2 Standard (Please refer to Preparation of Standards section)
- Sodium Chloride
- Sodium Dihydrogen Phosphate

For HPLC Method Only:

- Disodium Tetraborate
- O-phosphoric acid ( $H_3PO_4$ ) >85 %
- O-phthalaldehyde (OPA)
- 1-Thioglycerol

## Accessory Products

- Whatman No. 113 or No. 4 Filter Paper
- Glass Microfiber Filter Paper
- Immunoaffinity Column Rack (CR1)\*
- Immunoaffinity Column Accessory Pack (AP01)\*

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

## 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.

## 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.

## 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

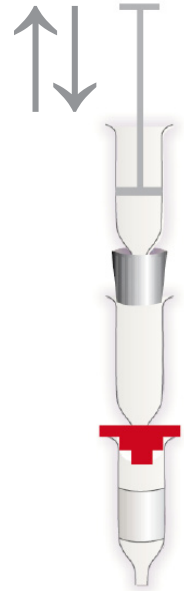
In order to fully elute the toxin/s from the immunoaffinity column it is vital that the solvent is in contact with the antibody within the gel suspension for a sufficient period of time. This ensures that all of the bonds between the antibody and the toxin are broken, ultimately releasing all of the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



## HPLC Information

### • Preparation of 0.1 M Borate Buffer

The buffer should be prepared fresh on the day of analysis.

1. Weigh 3.8 g of sodium tetraborate decahydrate into a glass jar.
2. Make up to 100 ml with water.

### • Preparation of OPA Reagent (with Mercaptoethanol or 1-Thioglycerol)

The reagent can be kept for up to 5 days if stored at 2 - 8 °C. The same reagent should be used throughout the procedure.

1. Weigh 120 mg of OPA into a glass jar.
2. Add 3 ml of 100 % methanol, 15 ml of borate buffer and either 150 µl of Mercaptoethanol or 179 µl of 1-Thioglycerol.
3. Leave overnight in the dark at room temperature.

### • Programming the Autosampler

Note: It is important that the standards and the sample eluates are injected onto the HPLC within 3 minutes if they contain OPA reagent with Mercaptoethanol or 10 minutes if they contain OPA reagent with 1-Thioglycerol. It is also recommended that the time period following addition of the OPA and injection onto the HPLC is kept constant for both samples and standards in order to reduce variability.

Program is set up such that an empty vial is placed in an autosampler position preceding that of the sample solution, e.g. for the first injection of a run, the mix vial is placed in position 1 while the sample solution to be injected into the mix vial is in position 2 on the autosampler.

1. 200 µl of OPA reagent is injected into the mixing vial.
2. 200 µl of eluate is injected into the mixing vial.
3. 200 µl of mix is drawn up and dispensed 3 times.
4. 100 µl of derivatised sample is injected onto the system.

## HPLC Information

### • Sample Preparation - Cereal

This method has been tested on a number of cereals including wheat, barley, maize, cornflour, popcorn, cornflakes and other cereal based products.

1. Weigh 25 g of sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 125 ml of acetonitrile : methanol : water (25 : 25 : 50 v/v/v) and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the extract through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Dilute 10 ml of the filtrate with 40 ml of phosphate buffered saline (PBS).
5. Filter the diluted extract through glass microfibre filter paper.
6. Pass 10 ml of the diluted filtrate (equivalent to 0.4 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.
7. Wash the column by passing 10 ml of PBS through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
8. Elute the toxins from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1.5 ml of 100 % methanol and collect in an amber glass vial. Please refer to the Elution section for further information.
9. Following elution pass 1.5 ml water through the column and collect in the same vial to give a 3 ml total volume.
10. Add 200  $\mu$ l of eluate to 200  $\mu$ l of OPA reagent. Program the autosampler to perform derivatisation of the sample. Please refer to the Programming the Autosampler section for further information.
11. Inject 100  $\mu$ l onto the HPLC system.



## HPLC Information

### • Preparation of Standards

Preparation of 150,000 ng/ml fumonisin stock solution:

1. Crystalline powder of fumonisin 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 150,000 ng/ml fumonisin (FB1 and FB2) stock solution.

Note: The ratio of FB1 to FB2 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 solution should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

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

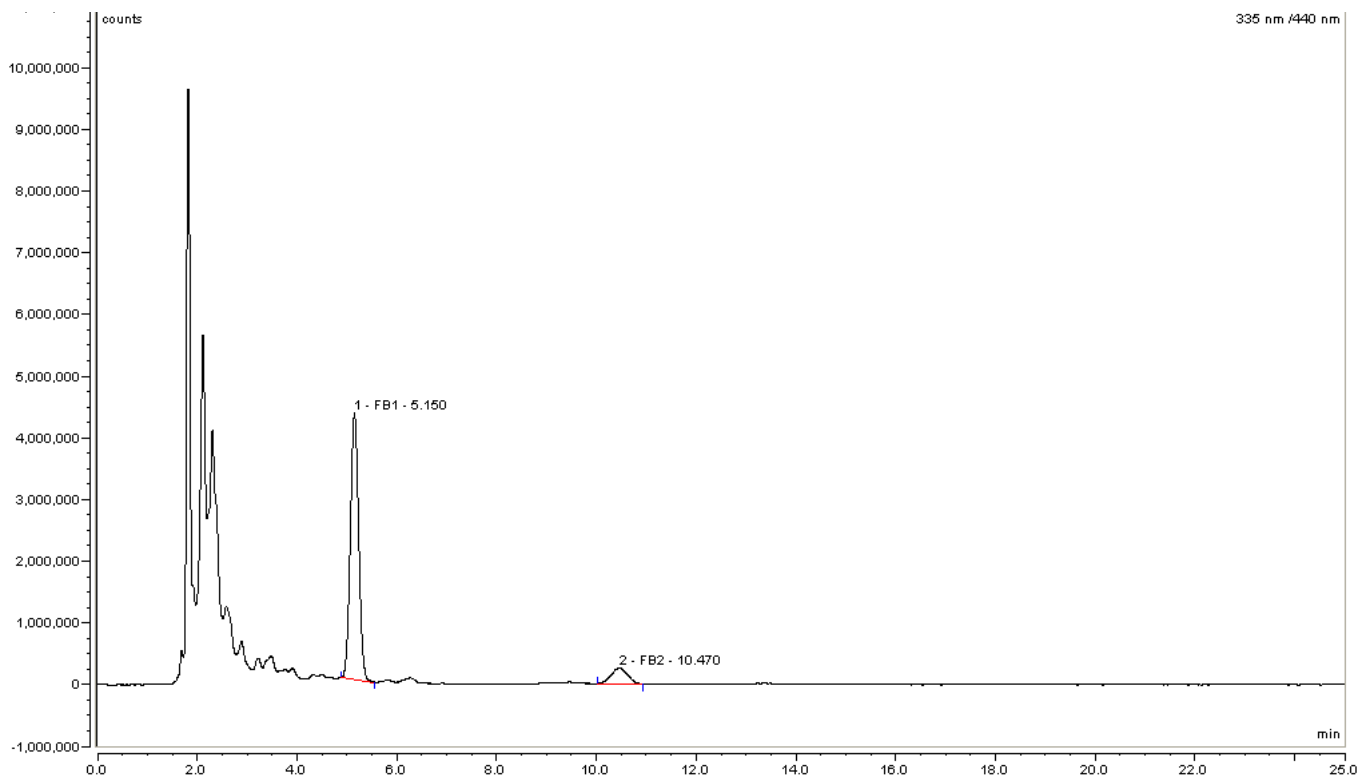
1. Measure 7.5 ml of acetonitrile : methanol : water (25 : 25 : 50 v/v/v) into an amber vial.
2. Remove 200 µl to waste.
3. Add 200 µl of 150,000 ng/ml total fumonisin standard to give a 4,000 ng/ml total fumonisin solution.
4. Standard 3: Take 500 µl of 4,000 ng/ml and add 1.5 ml of 50 % methanol (equivalent to 1,000 ng/ml).
5. Standard 2: Take 1 ml of 1,000 ng/ml and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 500 ng/ml).
6. Standard 1: Take 1 ml of 500 ng/ml and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 250 ng/ml).
7. Add 200 µl of each standard to 200 µl of OPA reagent. Program the autosampler to perform derivatisation of each solution. Please refer to the Programming the Autosampler section for further information.
8. Inject 100 µl of each solution onto the HPLC system.

## HPLC Information

- Recommended HPLC Conditions

HPLC Conditions	
Derivatisation	OPA Reagent
Guard Cartridge	C18 deactivated reverse phase cartridge or equivalent 10 mm x 4.6 mm i.d.
Analytical Column	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) or equivalent
Mobile Phase	Methanol : 0.1 M Sodium Dihydrogen Phosphate (77 : 23 v/v) Add 11.998 g of sodium phosphate to 1 l of water to give a 0.1 M solution. Adjust to pH 3.3 with o-phosphoric acid. Prepare fresh on day of analysis.
HPLC Pump	To deliver mobile phase
Flow Rate	1.0 ml per minute
Fluorescence Detector	Excitation: 335 nm Emission: 440 nm
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

- Example HPLC Chromatogram for Maize (Spiked at 1,000 ppb for FB1 and 500 ppb for FB2)



## LC-MS/MS Information

### • Sample Preparation - Cereal

This method has been tested on a number of cereals including wheat, barley, maize, cornflour, popcorn, cornflakes and other cereal based products.

1. Weigh 25 g of sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 125 ml of acetonitrile : methanol : water (25 : 25 : 50 v/v/v) and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the extract through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Dilute 10 ml of the filtrate with 40 ml of phosphate buffered saline (PBS).
5. Filter the diluted extract through glass microfibre filter paper.
6. Pass 10 ml of the diluted filtrate (equivalent to 0.4 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.
7. Wash the column by passing 20 ml of water through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
8. Elute the toxins from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1.5 ml of 100 % methanol and collect in an amber glass vial. Please refer to the Elution section for further information.
9. Following elution pass 1.5 ml water through the column and collect in the same vial to give a 3 ml total volume.
10. Inject 50  $\mu$ l onto the LC-MS/MS system.

## LC-MS/MS Information

### • Preparation of Standards

Preparation of 150,000 ng/ml fumonisin stock solution:

1. Crystalline powder of fumonisin 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 150,000 ng/ml fumonisin (FB1 and FB2) stock solution.

Note: The ratio of FB1 to FB2 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 solution should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

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

1. Measure 7.5 ml of 50 % methanol into an amber vial.
2. Remove 200 µl to waste.
3. Add 200 µl of 150,000 ng/ml total fumonisin standard to give a 4,000 ng/ml total fumonisin solution.
4. Standard 5: Take 500 µl of 4,000 ng/ml and add 1.5 ml of 50 % methanol (equivalent to 1,000 ng/ml).
5. Standard 4: Take 1 ml of 1,000 ng/ml and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 500 ng/ml).
6. Standard 3: Take 1 ml of 500 ng/ml and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 250 ng/ml).
7. Standard 2: Take 1 ml of 250 ng/ml and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 125 ng/ml).
8. Standard 1: Take 1 ml of 125 ng/ml and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 62.5 ng/ml).
9. Inject 50 µl of each solution onto the LC-MS/MS system.

## LC-MS/MS Information

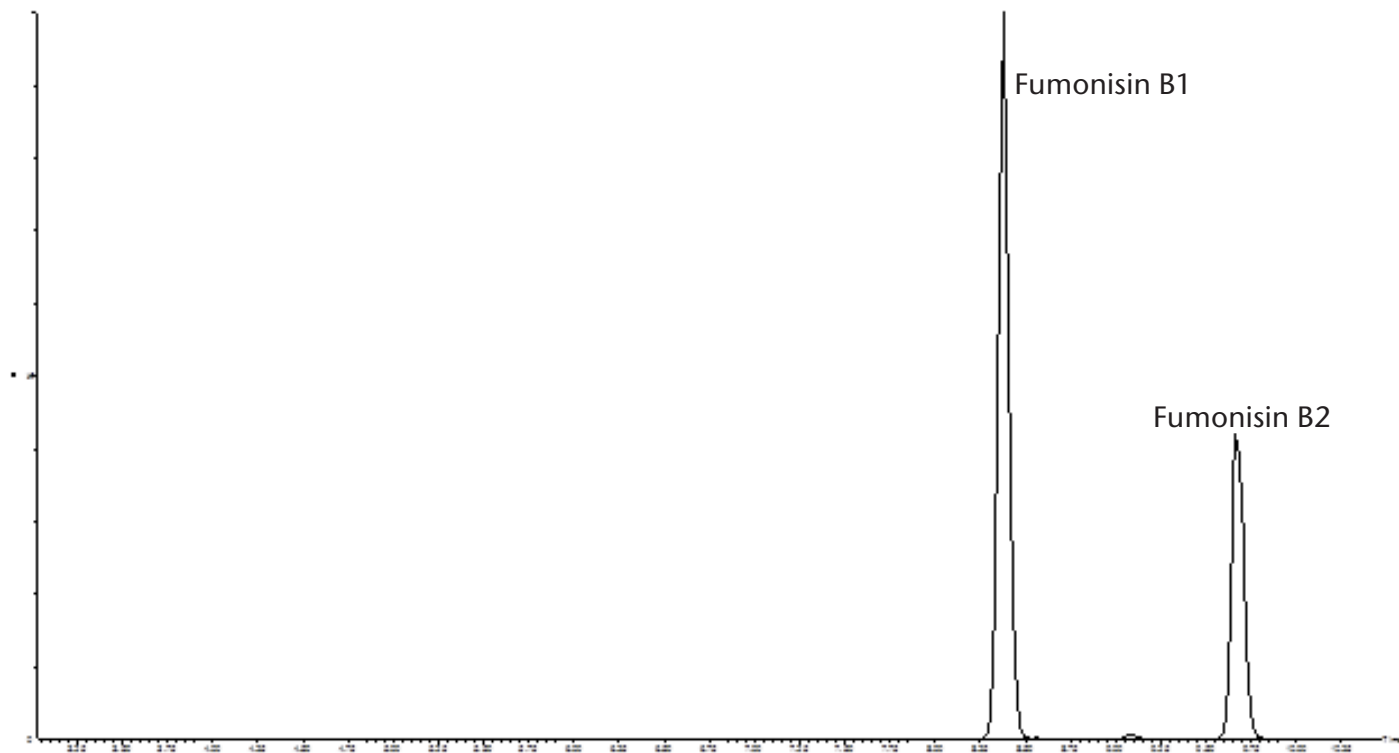
### • Recommended LC-MS/MS Conditions

LC Conditions			
Analytical Column	Phenomenex Gemini 5 $\mu$ m C18 110 A, 150 mm x 3 mm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: 1 mM Ammonium Formate and 0.1 % Formic Acid in 5 % Methanol  Solution B: 1 mM Ammonium Formate and 0.1 % Formic Acid in 98 % Methanol  Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	80	20
	0.1	80	20
	10	10	90
	15	10	90
	15.1	80	20
	20	80	20
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.3 ml per minute		
Column Heater	Maintain analytical column at 40 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	50 $\mu$ l		

Mass Spectrometry Conditions	
Instrument	Waters® ACQUITY TQ Detector with Electrospray Ionisation
Mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM) Mode with positive polarity
Capillary Voltage	+1,500 Volts
Source Temperature	150 °C
Desolvation Gas Temperature	350 °C
Desolvation Gas Flow	600 L/hr (N)
Cone Gas Flow	50 L/hr (N)

Instrument Setting						
Toxin	Time Segment (min)	Precursor Ion (m/z)	Product Ions (m/z)	Dwell Time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Voltage (eV)
Fumonisin B1	6.5 - 9.5	722.39 [M+H] <sup>+</sup>	334.39 (Quantifier)	0.105	52	40
			352.40 (Qualifier)		52	38
Fumonisin B2	8.5 - 10.5	706.39 [M+H] <sup>+</sup>	336.40 (Quantifier)	0.105	56	40
			318.39 (Qualifier)		56	42

- Example LC-MS/MS Total Ion Count Chromatogram for Maize (Spiked at 1,000 ppb for FB1 and 280 ppb for FB2)



## 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.

# FUMONIPREP®

Art. Nr.: RBRP31B

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

## Inhalt

	<b>Seite</b>
Testprinzip .....	16
Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien .....	16
Zubehörprodukte.....	16
Empfohlene Methoden und Applikationen.....	16
Gefahren .....	17
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise .....	17
Dekontamination .....	17
Lagerung und Haltbarkeit .....	17
Probennahme .....	17
Sensitivität .....	17
Wiederfindung .....	18
Säulenvorbereitung.....	18
Elution .....	19
HPLC Informationen.....	20
• Vorbereitung des 0.1 M Borat-Puffers .....	20
• Vorbereitung des OPA-Reagenz (mit Mercaptoethanol oder 1-Thioglycerol) .....	20
• Einstellen des Autosamplers .....	20
• Probenvorbereitung - Getreide .....	21
• Vorbereitung von Standards .....	22
• Kalibrierkurve .....	22
• Empfohlene HPLC-Bedingungen.....	23
• Typische HPLC-Chromatogramme von Mais (mit 1500 ppb versetzt) .....	23
LC-MS/MS Informationen.....	24
• Probenvorbereitung - Getreide .....	24
• Vorbereitung von Standards .....	25
• Kalibrierkurve .....	25
• Empfohlene HPLC-Bedingungen.....	26
• Typische LC-MS/MS Total Ionen Chromatogram von Weizen (mit 1000 ppb versetzt) .....	27
Qualität.....	28
Technische Unterstützung.....	28
Garantie .....	28



## Testprinzip

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

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension des monoklonalen Antikörpers, der spezifisch für das jeweilige Toxin ist. Im Anschluss an die Extraktion des Toxins wird der Probenextrakt gefiltert, verdünnt und langsam durch die Immunitätsäule geleitet. Die in der Probe vorhandenen Toxine werden vom Antikörper in der Gelsuspension gebunden. Die Säule wird gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen, und das Toxin wird mit einem geeigneten Lösungsmittel von der Säule eluiert. Das Eluat wird vor der HPLC LC-MS/MS Analyse gesammelt. Wenn die Fumonisin mit HPLC analysiert werden sollen, müssen sie vorher derivatisiert werden.

Die Extraktion und Reinigung dauert insgesamt ca. 30 Minuten. Das Ergebnis ist eine verbesserte Reinigung und Konzentration der Toxine aus Lebensmittel- und Futterproben, wodurch man ein viel saubereres 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

Für die HPLC und LC-MS/MS Methoden:

- Destilliertes / deionisiertes Wasser (geeignet zur Verwendung mit HPLC, z. B. MilliQ)
- Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril mit HPLC-Qualität)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (RBRRP202)\*
- Fumonisin B1- und B2-Standard (siehe Abschnitt "Vorbereitung von Standards")
- Natriumchlorid
- Natriumdihydrogenphosphat

Zusätzlich für die HPLC Methoden:

- Dinatriumtetraborat
- O-Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) > 85 %
- O-Phthaldialdehyd (OPA)
- 1-Thioglycerol

## Zubehörprodukte

- Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier
- Glasmikrofaserfilterpapier
- Immunitätsäulenständer (RBRCR1)\*
- Immunitätsäulen-Zubehörpaket (RBRAPO1)\*

\* Erhältlich bei R-Biopharm AG.

## Empfohlene Methoden und Applikationen

Für alle unter der gesetzlichen Rechtsvorschrift stehenden Matrices und Rohstoffe stehen Applikationen bereit und auch für einige weitere Rohstoffe sind Methoden auf Anfrage verfügbar. Veränderungen oder Abweichungen bei der Handhabung der beschriebenen Durchführungsanweisungen des Handbuchs können zu einem nicht optimalen Ergebnis führen. Bitte wenden Sie sich an die R-Biopharm AG wenn sie weitere Informationen benötigen.

## **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 12 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. Bitte beachten Sie, dass das Verhältnis von Lösungsmittel zu phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) beibehalten werden sollte.

## 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.



## HPLC Informationen

### • Vorbereitung des 0.1 M Borat-Puffers

Der Puffer sollte frisch am Tag des Einsatzes vorbereitet werden.

1. 3,8 g Natriumtetraborat-Decahydrat in einen Glasbecher einwiegen.
2. Mit Wasser bis auf 100 ml auffüllen.

### • Vorbereitung des OPA-Reagenz (mit Mercaptoethanol oder 1-Thioglycerol)

Das Reagenz kann für bis zu 5 Tage aufbewahrt werden, wenn es bei 2 - 8 °C gelagert wird.

1. 120 g OPA in einen Glasbecher einwiegen.
2. 3 ml 100 % Methanol, 15 ml Borat-Puffer und 150 µl Mercaptoethanol oder 179 µl 1-Thioglycerol zugeben.
3. Über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen lassen.

### • Einstellen des Autosamplers

Anmerkung: Es ist sehr wichtig, dass die Proben- und Standard-Eluate innerhalb von 3 Minuten in die HPLC eingespritzt werden, wenn das OPA Reagenz mit Mercaptoethanol versetzt wurde. Wenn 1-Thioglycerol dem OPA Reagenz hinzugeben wurde, muss die Injektion innerhalb von 10 Minuten stattfinden. Es ist außerdem zu beachten, dass die Zugabe des OPA Reagenz und die Injektion in die HPLC für die Standards und den Proben Zeitgleich durchgeführt wird um die Variation der Ergebnisse zu reduzieren.

Das Programm des Autosamplers sollte so eingestellt werden, dass jeweils ein leeres Röhrchen vorangehend jeder Proben platziert wird, z.B. für die erste Injektion eines Laufes sollte das Röhrchen zum Mixen in der ersten Position und die Probe, welche injiziert wird, in der zweiten Position geladen werden.

1. 200 µl OPA in das Röhrchen zum mixen hinzugeben.
2. 200 µl Eluat der Probe in das Röhrchen zum mixen hinzugeben.
3. 200 µl der Lösung 3 mal aufziehen und abgeben.
4. 100 µl der derivatisierten Probe in die HPLC injizieren.

## HPLC Informationen

### • Probenvorbereitung - Getreide

Diese Methode wurde anhand verschiedener Cerealien getestet, darunter Weizen, Gerste, Mais, Maisstärke und andere Getreide basierende Produkte.

1. 25 g Probe und 5 g Natriumchlorid in einen lösungsmittelresistenten Becher mit einer Kapazität von 1 Liter einwiegen.
2. 125 ml Acetonitril : Methanol : Wasser (25 : 25 : 50 v/v/v) zugeben und die Probe 2 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit in einem Mixer mischen.
3. Den Extrakt durch Filterpapier (z. B. Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) filtern oder bei 4.000 U/min 10 Minuten lang zentrifugieren.
4. 10 ml des Filtrats mit 40 ml der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) verdünnen.
5. Den verdünnten Extrakt durch ein Glasmikrofaserfilterpapier filtern.
6. 10 ml des verdünnten Filtrats (äquivalent zu 0,4 g der Probe) auf die Säule aufgeben und mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute 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.
7. Die Säule mit 10 ml PBS und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute waschen. Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
8. Die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 1,5 ml 100 % Methanol eluieren und in einem Glasröhrchen auffangen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
9. Nach der Elution 1,5 ml Wasser durch die Säule laufen lassen und im gleichen Röhrchen auffangen, um ein Volumen von insgesamt 3 ml zu erhalten.
10. Jeweils 200 µl des Eluats einer Probe in 200 µl des OPA Reagenz. Den Autosampler starten um die Derivatisierung durchzuführen. Bitte beachten Sie den Punkt „Einstellen des Autosampler“ für weitere Informationen und der Durchführung.
11. 100 µl derivatisiertes Eluat in das HPLC-System injizieren.

## HPLC Informationen

### • Vorbereitung von Standards

Herstellen einer 150.000ng/ml Fumonisin Stammlösung:

1. Kristallines Fumonisin in Pulverform kann bei R-Biopharm AG 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 Stammlösung zu erhalten.
2. Diese Stammlösung kann nun benutzt werden um eine 150.000ng/ml Fumonisin (FB1 und FB2) Standardlösung herzustellen.

Hinweis: Das Verhältnis von FB1 zu FB2 variiert bei jedem Standard. Bitte beachten Sie das korrekte Verhältnis für den erworbenen Standard.

### • Kalibrierkurve

Es wird empfohlen, mindestens eine 3 bis 6-Punkt-Kalibrierkurve zu erstellen. Durch die Konstruktion einer geeigneten Kurve müssten die Kalibrierstandards den Bereich oder Abschnitte der erwarteten Ergebnisse abdecken. Die verdünnten Standardlösungen sollten am Tag des Einsatzes frisch vorbereitet und innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden verwendet werden.

Beispiel der Herstellung einer drei Punkt Kalibrierkurve. (Diese kann je nach Grenzbereich oder Kontaminationsgrad angepasst werden):

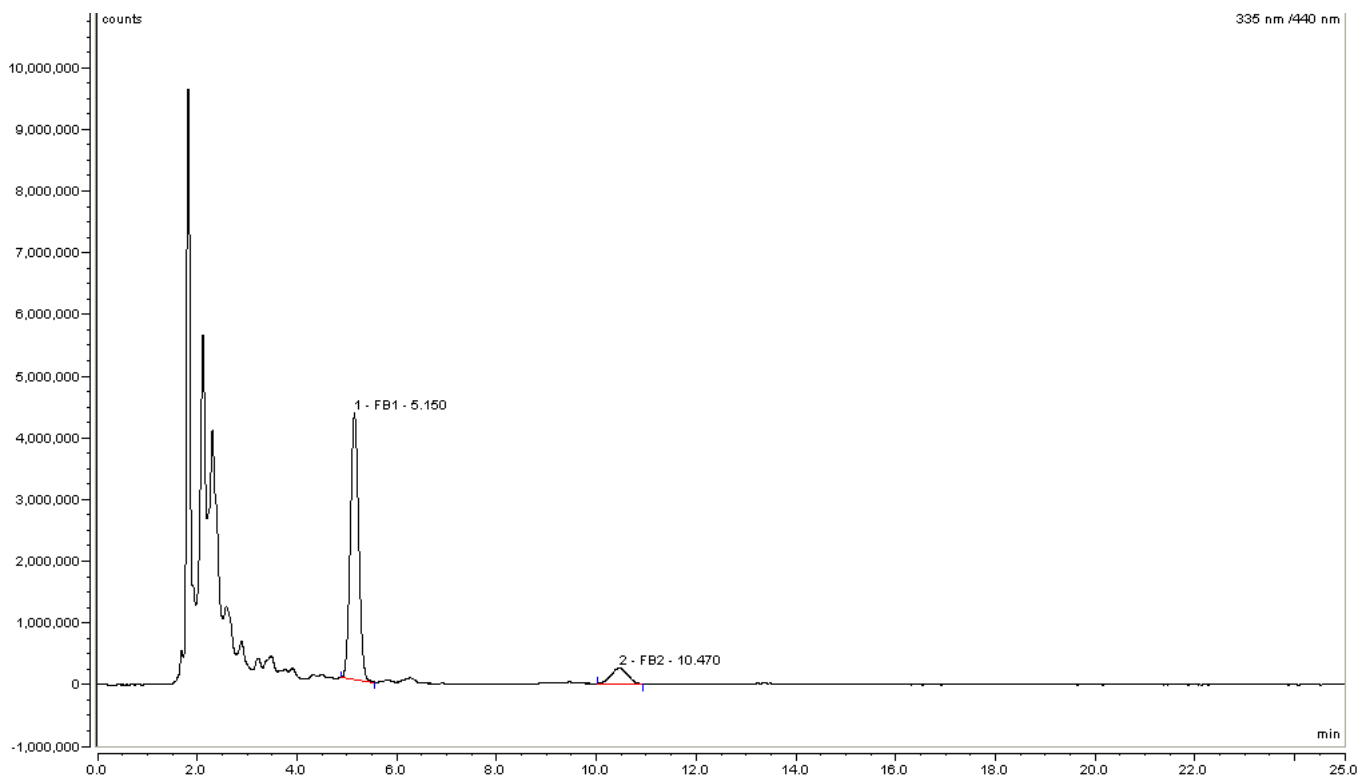
1. 7,5 ml von acetonitril : methanol : wasser (25 : 25 : 50 v/v/v) in einem Braunglasröhrchen abmessen.
2. 200 µl entfernen und entsorgen.
3. 200 µl der 150.000 ng/ml Stammlösung Fumonisin zugeben, um eine Fumonisin-Lösung von 4.000 ng/ml zu erhalten.
4. Standard 3: 500 µl von der 4.000 ng/ml Lösung nehmen und 1,5 ml einer 50 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 1.000 ng/ml).
5. Standard 2: 1 ml von der 1.000 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 50 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 500 ng/ml).
6. Standard 1: 1 ml von der 500 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 50 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 250 ng/ml).
7. Jeweils 200µl entsprechend für jeden Standard in 200 µl des OPA Reagenz überführen. Den Autosampler starten um die Derivatisierung durchzuführen. Bitte beachten Sie den Punkt „Einstellen des Autosampler“ für weitere Informationen und der Durchführung.
8. 100 µl der Lösung in das HPLC-System injizieren.

## HPLC Informationen

- **Empfohlene HPLC-Bedingungen**

HPLC-Bedingungen	
Derivatisierung	OPA Reagenz
Vorsäule	C18 deaktivierte Reversed-Phase-Kartusche oder Äquivalent 10 mm x 4,6 mm Innendurchmesser
Analytische Säule	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4,6 mm x 150 mm (Hichrom) oder Äquivalent
Mobile Phase	Methanol : 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat (77 : 23 v/v) 11,998 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> zu 1 l destilliertem Wasser zugeben, um eine 0,1 M Lösung zu erhalten. Mit o-Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3,3 einstellen.
HPLC-Pumpe	Für mobile Phase
Flussrate	1,0 ml pro Minute
Fluoreszenzdetektor	Anregung: 335 nm Emission: 440 nm
Säulenheizung	Hält die Vor- und die Analytische Säule bei 40 °C
Integrator/ Datenkontrollsystem	Von bevorzugtem Anbieter
Injektor	Autosampler / Rheodyne-Ventil
Injektionsvolumen	100 µl

- **Typische HPLC-Chromatogramme von Mais (mit 1000 ppb FB1 und 280 ppb FB2 versetzt)**





## LC-MS/MS Informationen

### • Probenvorbereitung - Getreide

Diese Methode wurde anhand verschiedener Cerealien getestet, darunter Weizen, Gerste, Mais, Maisstärke und andere Getreide basierende Produkte.

1. 25 g Probe und 5 g Natriumchlorid in einen lösungsmittelresistenten Becher mit einer Kapazität von 1 Liter einwiegen.
2. 125 ml Acetonitril : Methanol : Wasser (25 : 25 : 50 v/v/v) zugeben und die Probe 2 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit in einem Mixer mischen.
3. Den Extrakt durch Filterpapier (z. B. Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) filtern oder bei 4.000 U/min 10 Minuten lang zentrifugieren.
4. 10 ml des Filtrats mit 40 ml der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) verdünnen.
5. Den verdünnten Extrakt durch ein Glasmikrofaserfilterpapier filtern.
6. 10 ml des verdünnten Filtrats (äquivalent zu 0,4 g der Probe) auf die Säule aufgeben und mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute 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.
7. Die Säule mit 10 ml Wasser und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute waschen. Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
8. Die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 1,5 ml 100 % Methanol eluieren und in einem Glasröhrchen auffangen. Eine Rückspülung wird empfohlen. Siehe Abschnitt "Rückspülung" für weitere Informationen.
9. Nach der Elution 1,5 ml Wasser durch die Säule laufen lassen und im gleichen Röhrchen auffangen, um ein Volumen von insgesamt 3 ml zu erhalten.
10. Jeweils 200 µl des Eluats einer Probe in 200 µl des OPA Reagenz. Den Autosampler starten um die Derivatisierung durchzuführen. Bitte beachten Sie den Punkt „Einstellen des Autosampler“ für weitere Informationen und der Durchführung.
11. 50 µl Eluat in das LC-MS/MS System injizieren.

## LC-MS/MS Informationen

### • Vorbereitung von Standards

Herstellen einer 150.000ng/ml Fumonisin Stammlösung:

1. Kristallines Fumonisin in Pulverform kann bei R-Biopharm AG 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 Stammlösung zu erhalten.
2. Diese Stammlösung kann nun benutzt werden um eine 150.000ng/ml Fumonisin (FB1 und FB2) Standardlösung herzustellen.

Hinweis: Das Verhältnis von FB1 zu FB2 variiert bei jedem Standard. Bitte beachten Sie das korrekte Verhältnis für den erworbenen Standard.

### • Kalibrierkurve

Es wird empfohlen, mindestens eine 3 bis 6-Punkt-Kalibrierkurve zu erstellen. Durch die Konstruktion einer geeigneten Kurve müssten die Kalibrierstandards den Bereich oder Abschnitte der erwarteten Ergebnisse abdecken. Die verdünnten Standardlösungen sollten am Tag des Einsatzes frisch vorbereitet und innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden verwendet werden.

Beispiel der Herstellung einer drei Punkt Kalibrierkurve. (Diese kann je nach Grenzbereich oder Kontaminationsgrad angepasst werden):

1. 7,5 ml von acetonitril : methanol : wasser (25 : 25 : 50 v/v/v) in einem Braunglasröhrchen abmessen.
2. 200 µl entfernen und entsorgen.
3. 200 µl der 150.000 ng/ml Stammlösung Fumonisin zugeben, um eine Fumonisin-Lösung von 4.000 ng/ml zu erhalten.
4. Standard 5: 500 µl von der 4.000 ng/ml Lösung nehmen und 1,5 ml einer 50 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 1.000 ng/ml).
5. Standard 4: 1 ml von der 1.000 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 50 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 500 ng/ml).
6. Standard 3: 1 ml von der 500 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 50 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 250 ng/ml).
7. Standard 2: 1 ml von der 250 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 50 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 125 ng/ml).
8. Standard 1: 1 ml von der 125 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 50 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 62,5 ng/ml).
9. 50 µl jeder Lösung in das LC-MS/MS System injizieren.

## LC-MS/MS Informationen

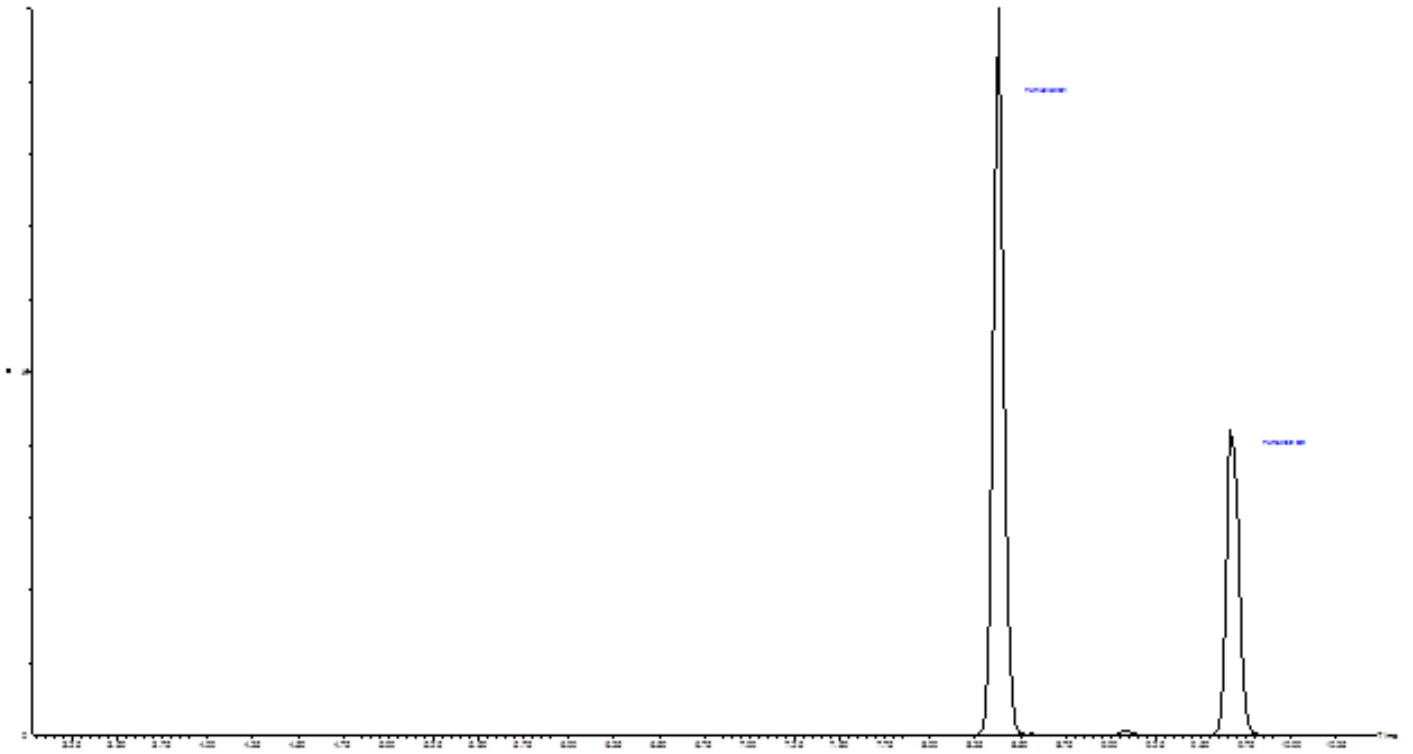
### • Empfohlene LC-MS/MS Bedingungen

LC Conditions			
Analytical Column	Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 A, 150 mm x 3 mm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: 1 mM Ammonium Formate and 0.1 % Formic Acid in 5 % Methanol  Solution B: 1 mM Ammonium Formate and 0.1 % Formic Acid in 98 % Methanol  Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	80	20
	0.1	80	20
	10	10	90
	15	10	90
	15.1	80	20
	20	80	20
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.3 ml per minute		
Column Heater	Maintain analytical column at 40 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	50 µl		

Mass Spectrometry Conditions	
Instrument	Waters® ACQUITY TQ Detector with Electrospray Ionisation
Mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM) Mode with positive polarity
Capillary Voltage	+1,500 Volts
Source Temperature	150 °C
Desolvation Gas Temperature	350 °C
Desolvation Gas Flow	600 L/hr (N)
Cone Gas Flow	50 L/hr (N)

Instrument Setting						
Toxin	Time Segment (min)	Precursor Ion (m/z)	Product Ions (m/z)	Dwell Time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Voltage (eV)
Fumonisin B1	6.5 - 9.5	722.39 [M+H] <sup>+</sup>	334.39 (Quantifier)	0.105	52	40
			352.40 (Qualifier)		52	38
Fumonisin B2	8.5 - 10.5	706.39 [M+H] <sup>+</sup>	336.40 (Quantifier)	0.105	56	40
			318.39 (Qualifier)		56	42

- Typische LC-MS/MS Total Ionen Chromatogram von Weizen (mit 1000 ppb FB1 und 280 ppb FB2 versetzt)



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