

AFLAOCHRA PREP[®]

Product Code: P89 / P89B

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

P89/V14/23.09.21

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
HPLC Information.....	7
• Sample Preparation - Cereal.....	7
• Sample Preparation - Spices and Dried Fruit.....	8
• Preparation of Standards.....	9
• Calibration Curve.....	9
• Recommended HPLC Conditions.....	10
• HPLC Information Typical Chromatograms.....	11
• Example HPLC Chromatogram for Maize (spiked at 10 ppb Total Aflatoxin and 5 ppb Ochratoxin)....	11
• Example HPLC Chromatogram for Paprika (spiked at 10 ppb Total Aflatoxin and 40 ppb Ochratoxin)	11
LC-MS/MS Information.....	12
• Sample Preparation - Cereal.....	12
• Sample Preparation - Spices.....	13
• Preparation of Standards.....	14
• Calibration Curve.....	14
• Recommended LC-MS/MS Conditions.....	15
• Example LC-MS/S Chromatogram for Maize (spiked at 10 ppb for Toal Aflatioxin and 5 ppb for Ochratoxin.....	16
• Example LC-MS/S Chromatogram for Paprika (spiked at 10 ppb for Toal Aflatioxin and 40 ppb for Ochratoxin.....	16
Quality.....	17
Technical Support.....	17
Warranty.....	17

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 antibodies 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 and injected 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)*
- Mycotoxin Standards (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
- Glass Microfibre 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

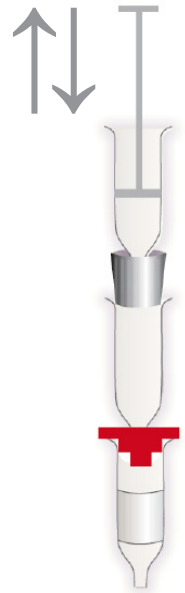
In order to fully elute the toxin/s from the immunoaffinity column it is vital that the solvent is in contact with the antibody within the gel suspension for a sufficient period of time. This ensures that all of the bonds between the antibody and the toxin are broken, ultimately releasing all of the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



HPLC Information

• Sample Preparation - Cereal

This method has been tested on a number of cereals and pseudo cereals including wheat, barley, maize, quinoa, millet, spelt and bulgur wheat.

1. Weigh 25 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 the filtrate with 18 ml of phosphate buffered saline (PBS).
5. Filter the diluted extract through glass microfibre filter paper.
6. Pass 10 ml of the filtrate (equivalent to 0.25 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 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 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 ml of water through the column and collect in the same vial to give a 2 ml total volume.
10. Inject 100 µl onto the HPLC system.

HPLC Information

• Sample Preparation - Spices and Dried Fruit

This method has been tested on a number of spices including paprika and black pepper, and dried fruit including sultanas, raisins, figs and apricots.

Note: There is a specific application note available for paprika oleoresin and turmeric.

1. Weigh 25 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 the filtrate with 18 ml of 10 % Tween 20 in phosphate buffered saline (PBS).
5. Adjust to around pH 7.4 using 2 M sodium hydroxide.
6. Filter the diluted extract through glass microfibre filter paper.
7. Pass 10 ml of the filtrate (equivalent to 0.25 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 µl onto the HPLC system.

HPLC Information

• Preparation of Standards

It is advised to start with a 1,000 ng/ml total aflatoxin 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.

• Ochratoxin A Stock Solution

It is advised to start with a 1,000 ng/ml ochratoxin A solution.

Combined Working Standard

1. Measure 2.5 ml of 100 % methanol into an amber vial.
2. Remove 160 µl to waste.
3. Add 100 µl of 1,000 ng/ml total aflatoxin standard and 60 µl of 1,000 ng/ml ochratoxin standard.
4. Add 2.5 ml of water to give a 20 ng/ml total aflatoxin and 12 ng/ml ochratoxin combined solution.

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):

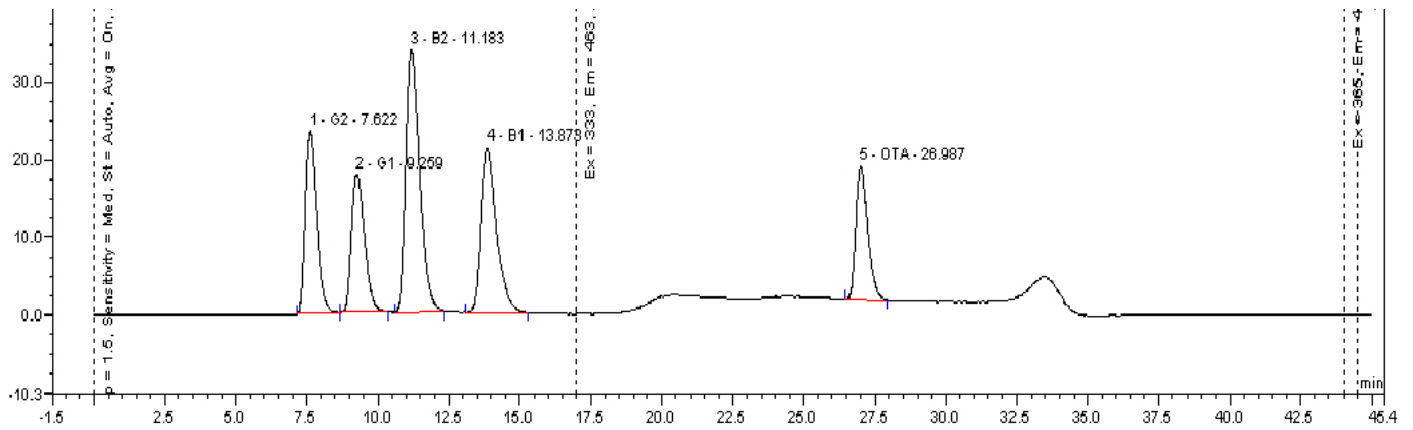
1. Standard 4: Take 250 µl of 20 ng/ml total aflatoxin solution and 12 ng/ml of ochratoxin A combined standard, and make up to 2 ml with 50 % methanol (equivalent to 2.5 ng/ml of total aflatoxin and 1.5 ng/ml of ochratoxin A).
2. Standard 3: Take 1 ml of 2.5 ng/ml of total aflatoxin and 1.5 ng/ml of ochratoxin A and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 1.25 ng/ml of total aflatoxin and 0.75 ng/ml of ochratoxin A).
3. Standard 2: Take 1 ml of 1.25 ng/ml of total aflatoxin and 0.75 ng/ml of ochratoxin A and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 0.625 ng/ml of total aflatoxin and 0.375 ng/ml of ochratoxin A).
4. Standard 1: Take 800 µl at 0.625 ng/ml of total aflatoxin and 0.375 ng/ml of ochratoxin A and make up to 2 ml with 50 % methanol (equivalent to 0.25 ng/ml of total aflatoxin and 0.15 ng/ml of ochratoxin A).
5. Inject 100 µl of each solution onto the HPLC system. The elution order for total aflatoxins is G2, G1, B2, B1 and ochratoxin A when derivatising with a KOBRA® CELL.

HPLC Information

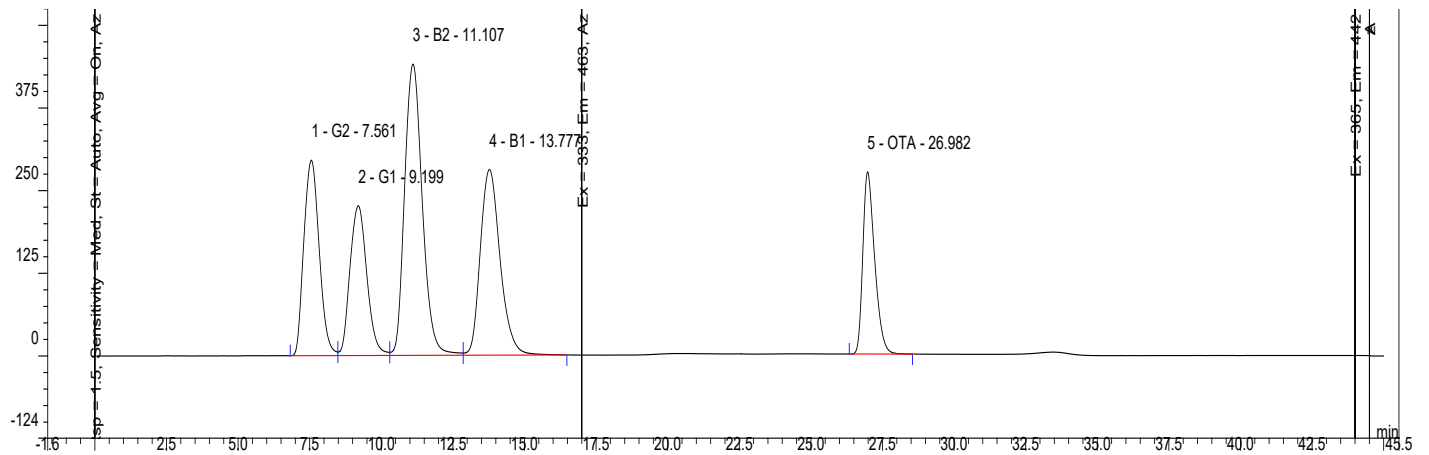
HPLC Conditions			
Derivatisation	KOBRA® CELL at 100 µA setting		
Guard Cartridge	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm (Hichrom) or equivalent		
Analytical Column	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: Water : Methanol (55 : 45 v/v) Solution B: Water : Methanol (20 : 80 v/v) Add 119 mg of potassium bromide and 350 µl 4 M Nitric Acid to 1 litre of mobile phase A and B. Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	100	0
	14	100	0
	16	35	65
	30	35	65
	31	100	0
	40	100	0
HPLC Pump	From preferred supplier		
Flow Rate	0.8 ml per minute		
Fluorescence Detector	Time (min)	Excitation (nm)	Emission (nm)
	0	365	442
	17	333	463
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, ochratoxin A		

HPLC Information - Typical Chromatograms

- Example HPLC Chromatogram for Maize (spiked at 10 ppb Total Aflatoxin and 5 ppb Ochratoxin)



- Example HPLC Chromatogram for Paprika (spiked at 10 ppb Total Aflatoxin and 40 ppb Ochratoxin)



LC-MS/MS Information

• Sample Preparation - Cereal

1. Weigh 25 g of 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 extract through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Dilute 8 ml of the filtrate with 72 ml of phosphate buffered saline (PBS).
5. Filter the diluted extract through glass microfibre filter paper.
6. Pass 20 ml of the diluted filtrate (equivalent to 0.5 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 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 ml water through the column and collect in the same vial to give a 2 ml total volume.
10. Inject 25 μ l onto the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS Information

• Sample Preparation - Spices

1. Weigh 25 g of 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 extract through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Dilute 4 ml of the filtrate with 36 ml of 10 % Tween 20 phosphate buffered saline (PBS). Adjust to around pH 7.4 using 2 M of sodium hydroxide.
5. Filter the diluted extract through glass microfibre filter paper.
6. Pass 10 ml of the diluted filtrate (equivalent to 0.25 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 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 ml water through the column and collect in the same vial to give a 2 ml total volume.
10. Inject 25 μ l onto the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS Information

Preparation of Standards

• Aflatoxin Stock Solution

It is advised to start with a 1,000 ng/ml total aflatoxin 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.

• Ochratoxin A Stock Solution

It is advised to start with a 1,000 ng/ml ochratoxin A solution.

Combined Working Standard

1. Measure 2.5 ml of 100 % methanol into an amber vial.
2. Remove 160 µl to waste.
3. Add 100 µl of 1,000 ng/ml total aflatoxin standard and 60 µl of 1,000 ng/ml ochratoxin standard.
4. Add 2.5 ml of water to give a 20 ng/ml total aflatoxin and 12 ng/ml ochratoxin combined solution.

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 250 µl of 20 ng/ml total aflatoxin solution and 12 ng/ml of ochratoxin A combined standard, and make up to 2 ml with 50 % methanol (equivalent to 2.5 ng/ml of total aflatoxin and 1.5 ng/ml of ochratoxin A).
2. Standard 3: Take 1 ml of 2.5 ng/ml of total aflatoxin and 1.5 ng/ml of ochratoxin A and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 1.25 ng/ml of total aflatoxin and 0.75 ng/ml of ochratoxin A).
3. Standard 2: Take 1 ml of 1.25 ng/ml of total aflatoxin and 0.75 ng/ml of ochratoxin A and add 1 ml of 50 % methanol (equivalent to 0.625 ng/ml of total aflatoxin and 0.375 ng/ml of ochratoxin A).
4. Standard 1: Take 800 µl at 0.625 ng/ml of total aflatoxin and 0.375 ng/ml of ochratoxin A and make up to 2 ml with 50 % methanol (equivalent to 0.25 ng/ml of total aflatoxin and 0.15 ng/ml of ochratoxin A).
5. Inject 100 µl of each solution onto the HPLC system. The elution order for total aflatoxins is G2, G1, B2, B1 and ochratoxin A when derivatising with a KOBRA® CELL.

LC-MS/MS Information

• Recommended LC-MS/MS Conditions

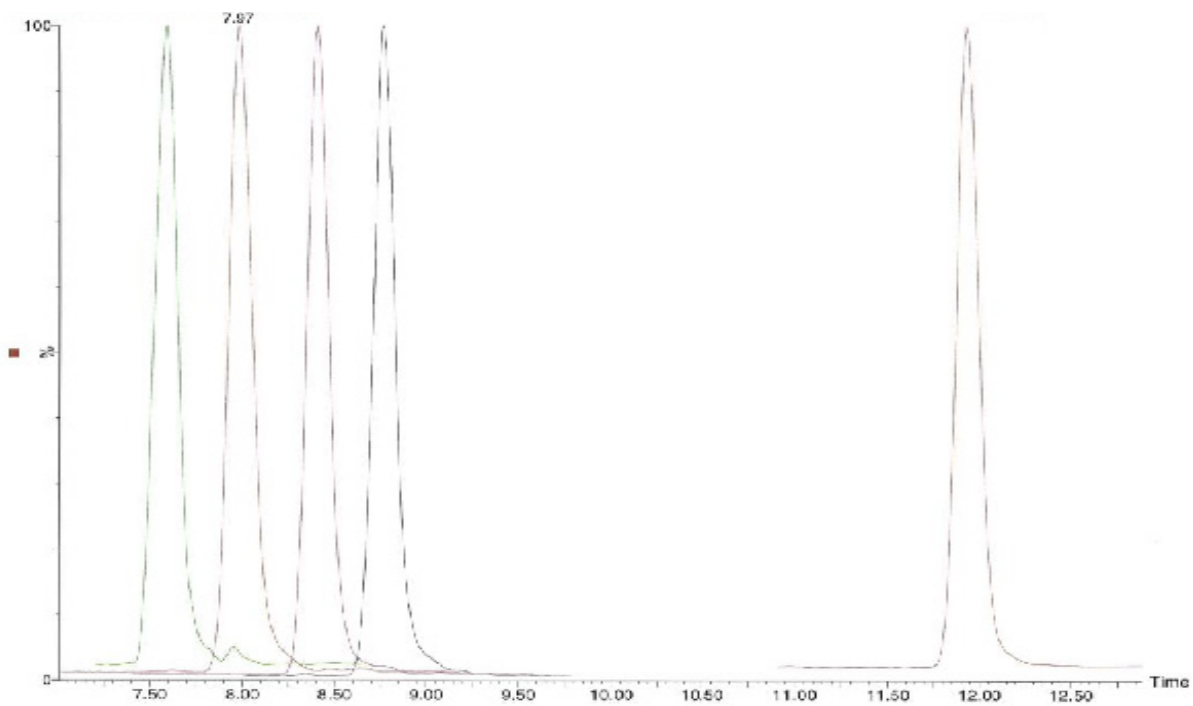
LC Conditions			
Analytical Column	Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 A, 150 mm x 3 mm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: 1 mM Ammonium Formate and 0.1 % Formic Acid in (95 : 5 v/v) Water : Methanol Solution B: 1 mM Ammonium Formate and 0.1 % Formic Acid in (2 : 98 v/v) Water : Methanol Prepare fresh 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	+0.64 KV
Source Temperature	150 °C
Desolvation Gas Temperature	350 °C
Desolvation Gas Flow	800 L/hr (N)
Cone Gas Flow	50 L/hr (N)

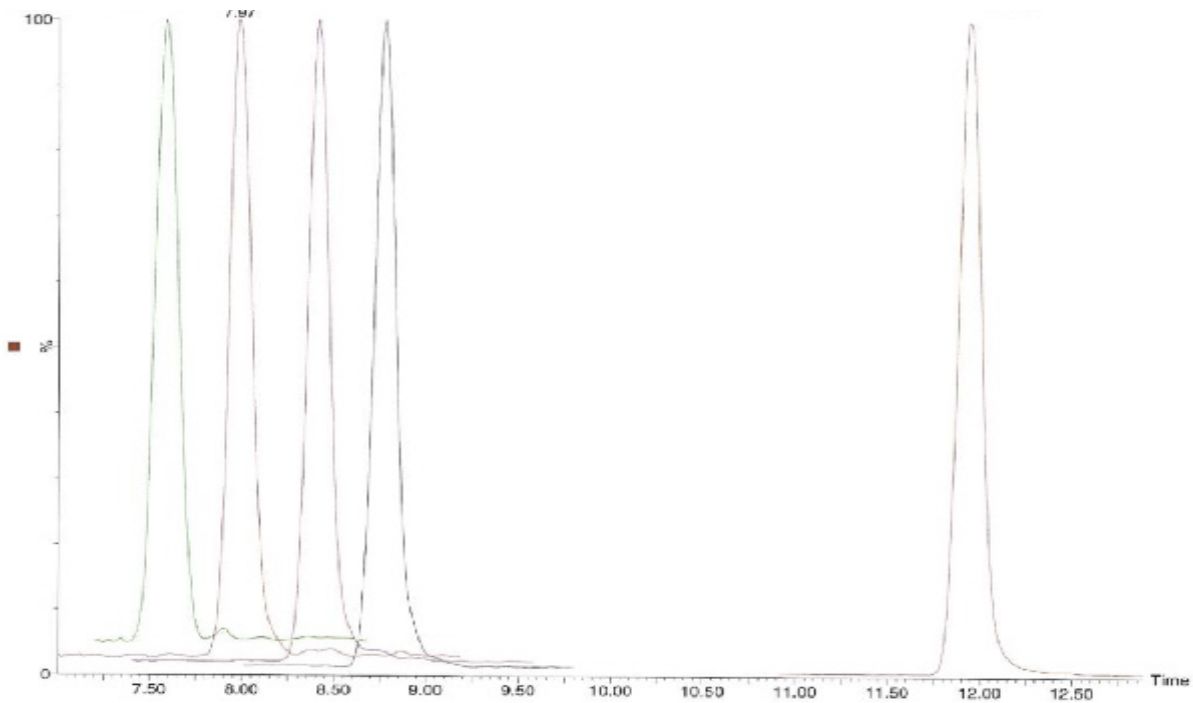
Instrument Setting						
Toxin	Time Segment (min)	Precursor Ion (m/z)	Product Ions (m/z)	Dwell Time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Voltage (eV)
AFT G2	7.81	330.9 [M+H] ⁺	245.13 (Quantifier)	0.102	54	32
			189.07 (Qualifier)		54	42
AFT G1	8.21	328.9 [M+H] ⁺	243.06 (Quantifier)	0.102	52	28
			199.88 (Qualifier)		52	42
AFT B2	8.66	314.9 [M+H] ⁺	281.12 (Quantifier)	0.102	58	26
			259.15 (Qualifier)		58	30
AFT B1	9.02	312.9 [M+H] ⁺	284.93 (Quantifier)	0.102	50	22
			241.10 (Qualifier)		50	36
OTA	12.03	403.9	239.0 (Quantifier)	0.428	32	22
			358.1 (Qualifier)		32	14

LC-MS/MS Information - Typical Chromatograms

- Example LC-MS/MS Chromatogram for Maize (spiked at 10 ppb Total Aflatoxin and 5 ppb Ochratoxin)



- Example LC-MS/MS Chromatogram for Paprika (spiked at 10 ppb Total Aflatoxin and 40 ppb Ochratoxin)



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.

Inhalt

	Seite
Testprinzip	19
Nicht enthaltene Reagenzien	19
Zubehörprodukte	19
Gefahren	19
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise	19
Dekontamination	20
Lagerung & Mindesthaltbarkeit	20
Probennahme	20
Sensitivität	20
Wiederfindungen	20
Säulenvorbereitung	20
Elution	21
HPLC-Informationen	22
• Probenvorbereitung – Zerealie	22
• Probenvorbereitung – Gewürze und Trockenfrüchte	23
• Vorbereitung von Standards	24
• Kalibrierkurve	24
• Empfohlene HPLC-Bedingungen	25
• HPLC-Informationen – Typische Chromatogramme	26
• Beispiel für ein HPLC-Chromatogramm für Mais (mit Dotierung bei 10 ppb Gesamt-Aflatoxin und 5 ppb Ochratoxin)	26
• Beispiel für ein HPLC-Chromatogramm für Paprika (mit Dotierung bei 10 ppb Gesamt-Aflatoxin und 40 ppb Ochratoxin)	26
LC-MS/MS-Informationen	27
• Probenvorbereitung – Zerealie	27
• Probenvorbereitung – Gewürze	28
• Vorbereitung von Standards	29
• Kalibrierkurve	29
• Empfohlene LC-MS/MS-Bedingungen	30
• Beispiel für ein LC-MS/S-Chromatogramm für Mais (mit Dotierung bei 10 ppb Gesamt-Aflatoxin und 5 ppb Ochratoxin)	31
• Beispiel für ein LC-MS/S-Chromatogramm für Paprika (mit Dotierung bei 10 ppb für Gesamt-Aflatoxin und 40 ppb für Ochratoxin)	31
Qualität	32
Technischer Support	32
Garantie	32

Testprinzip

Das Verfahren basiert auf monoklonaler Antikörpertechnologie, die den Test äußerst spezifisch, sensibel, schnell und einfach durchzuführen macht.

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension monoklonaler Antikörper, die für die interessierenden Toxine spezifisch sind.

Nach der Extraktion der Toxine wird das Probenextrakt filtriert, verdünnt und langsam durch die Immunoaffinitätssäule gegeben. 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 Extrahierungs- 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 (zu pH-Filtrat, 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
- Glas-Mikrofaser-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 erreicht. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort.

Dekontamination

Überschüssige Standardlösungen 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 % Aceton hinzufügen. Vor der Entsorgung mit reichlich Wasser spülen. Laborutensilien nach der Dekontamination gründlich abwaschen. Abfall verbrennen, falls es die Vorschriften erlauben.

Lagerung & 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 einen Puffer über dem Gel enthält. Der in der Immunoaffinitätssäule enthaltene Antikörper kann durch extreme Temperatur oder eine Änderung des pH-Werts denaturiert werden.

Probenahme

Es sollte eine repräsentative Probe durch Befolgung eines der offiziell anerkannten Probennahmeverfahren erhalten 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 von 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 Extrahierung berücksichtigen möchte, wird empfohlen, eine dotierte Probe desselben Rohstofftyps 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 Verwendung Umgebungstemperatur haben. Kappe oben an der Säule abnehmen und wegwerfen. Säule fest mithilfe eines Adapters an einem Glasspritzenzylinder anbringen und in einen Immunoaffinitätssäulenständer oder einen Klemmständer platzieren.

Elution

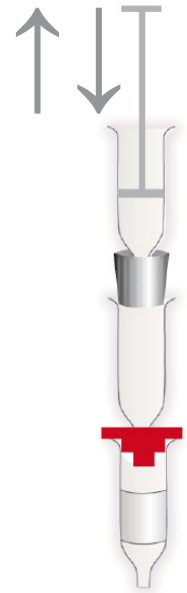
Um das/die Toxine/e vollständig aus der Immunaффinitätssäule zu eluieren, muss das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper in der Gelsuspension in Kontakt sein. Dadurch wird sichergestellt, dass alle Bindungen zwischen dem Antikörper und dem Toxin aufgebrochen werden und so das gesamte Toxin aus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



HPLC-Informationen

• Probenvorbereitung – Zerealie

Diese Methode wurde an einer Reihe von Getreiden und Pseudogetreidearten 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%ige-Methanol-Lösung 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 diese für 10 Minuten bei 4.000 RPM.
4. Verdünnen Sie 2 ml des Filtrats mit 18 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).
5. Filtrieren Sie das verdünnte Extrakt durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier.
6. Lassen Sie 10 ml des Filtrats (entspricht 0,25 g der Probe) mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen (oder Sie können die Probe kann mittels Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, falls bevorzugt). Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Erfassung der Toxine durch den Antikörper unerlässlich.
7. Waschen Sie die Säule, indem Sie 20 ml PBS mit einer Flussrate von ca. 5 ml pro Minute hindurch laufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
8. Eluieren Sie die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1 ml einer 100%igen Methanol-Lösung und sammeln Sie dies in einem bernsteinfarbenen Glasgefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
9. Lassen Sie nach der Elution 1 ml Wasser durch die Säule laufen und sammeln sie dies im selben Gefäß, sodass es ein Gesamtvolumen von 2 ml ergibt.
10. Injizieren Sie 100 µl in das HPLC-System.

HPLC-Informationen

• Probenvorbereitung – Gewürze und Trockenfrüchte

Diese Methode wurde bei einer Reihe von Gewürzen, darunter Paprika und Pfeffer, und 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%ige Methanol-Lösung 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 diese für 10 Minuten bei 4.000 RPM.
4. Verdünnen Sie 2 ml des Filtrats mit 18 ml 10 % Tween 20 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).
5. Stellen Sie dies mithilfe von 2 M Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 7,4 ein.
6. Filtrieren Sie das verdünnte Extrakt durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier.
7. Lassen Sie 10 ml des Filtrats (entspricht 0,25 g der Probe) mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen (oder Sie können die Probe kann mittels Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, falls bevorzugt). Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Erfassung der Toxine durch den Antikörper unerlässlich.
8. Waschen Sie die Säule, indem Sie 20 ml PBS mit einer Flussrate von ca. 5 ml pro Minute hindurch laufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
9. Eluieren Sie die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1 ml einer 100%igen Methanol-Lösung und sammeln Sie dies in einem bernsteinfarbenen Glasgefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
10. Lassen Sie nach der Elution 1 ml Wasser durch die Säule laufen und sammeln sie dies im selben Gefäß, sodass es ein Gesamtvolumen von 2 ml ergibt.
11. Injizieren Sie 100 µl in das HPLC-System.

HPLC-Informationen

• Vorbereitung von Standards

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 A-Stammlösung

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

Kombinierter Arbeitsstandard

1. Messen Sie 2,5 ml 100%ige Methanol-Lösung in einem bernsteinfarbenen Gefäß 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):

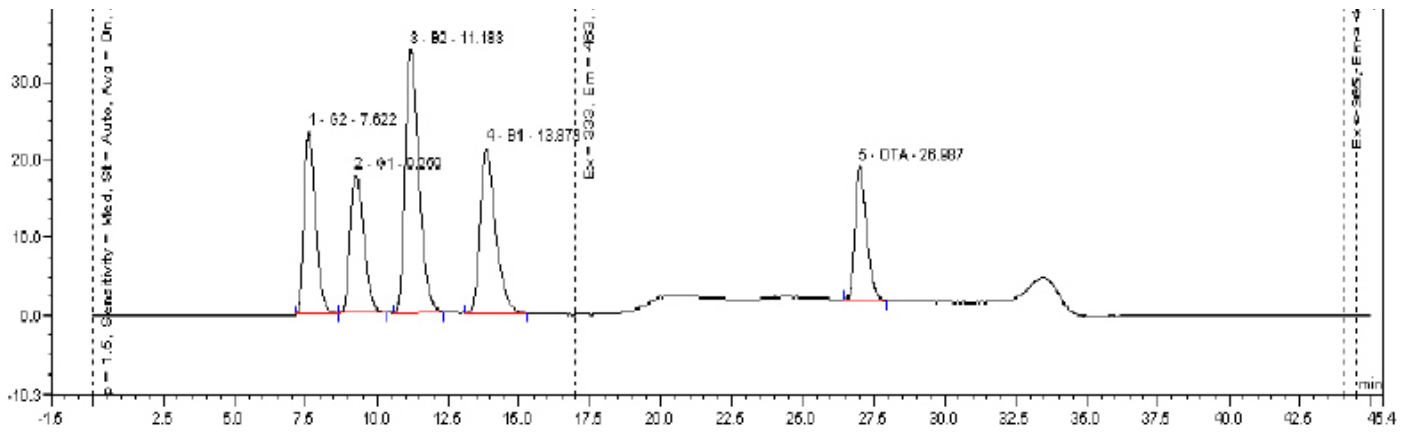
1. Standard 4: Nehmen Sie 250 µl des kombinierten Standards von 20 ng/ml Gesamt-Aflatoxin-Lösung und 12 ng/ml Ochratoxin A und füllen Sie mit 50%iger Methanol-Lösung auf 2 ml auf (entspricht 2,5 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 1,5 ng/ml Ochratoxin A).
2. Standard 3: Nehmen Sie 1 ml von 2,5 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 1,5 ng/ml Ochratoxin A und fügen Sie 1 ml 50%iger Methanol-Lösung hinzu (entspricht 1,25 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,75 ng/ml Ochratoxin A).
3. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml von 1,25 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,75 ng/ml Ochratoxin A und fügen Sie 1 ml 50%iger Methanol-Lösung hinzu (entspricht 0,625 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,375 ng/ml Ochratoxin A).
4. Standard 1: Nehmen Sie 800 µl von 0,625 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,375 ng/ml Ochratoxin A und füllen Sie mit 50%iger Methanol-Lösung auf 2 ml auf (entspricht 0,25 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,15 ng/ml Ochratoxin A).
5. 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.

• **Empfohlene HPLC-Bedingungen**

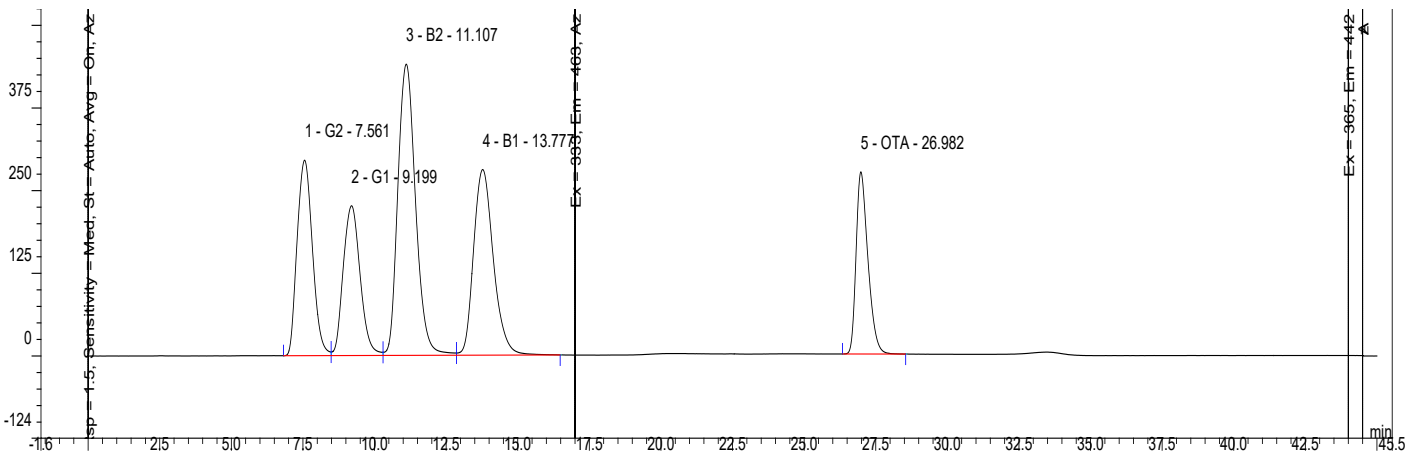
HPLC-Bedingungen			
Derivatisierung	Einstellung KOBRA® CELL bei 100 µA		
Vorläufersäulenkartusche	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm (Hichrom) oder gleichwertig		
Analytische Trennsäule	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4,6 mm x 150 mm (Hichrom) oder gleichwertig		
Mobile Phase	Lösung A: Wasser : Methanol (55 : 45 v/v) Lösung 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		

HPLC-Informationen – Typische Chromatogramme

- Beispiel für ein HPLC-Chromatogramm für Mais (mit Dotierung bei 10 ppb Gesamt-Aflatoxin und 5 ppb Ochratoxin)



- Beispiel für ein HPLC-Chromatogramm für Paprika (mit Dotierung bei 10 ppb Gesamt-Aflatoxin und 40 ppb Ochratoxin)



LC-MS/MS-Informationen

• Probenvorbereitung – Zerealie

1. Wiegen Sie 25 g Probe und 5 g Natriumchlorid in einem lösungsmittelbeständigen Mischglas mit einem Fassungsvermögen von 1 Liter ab.
2. Fügen Sie 100 ml 80%ige-Methanol-Lösung hinzu und mischen Sie mit hoher Geschwindigkeit für 2 Minuten.
3. Filtrieren Sie das Extrakt durch Filterpapier (Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder zentrifugieren dieses für 10 Minuten bei 4.000 RPM.
4. Verdünnen Sie 8 ml des Filtrats mit 72 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).
5. Filtrieren Sie das verdünnte Extrakt durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier.
6. Lassen Sie 20 ml des verdünnten Filtrats (entspricht 0,5 g der Probe) mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen (oder Sie können die Probe kann mittels Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, falls bevorzugt). Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Erfassung der Toxine durch den Antikörper unerlässlich.
7. Waschen Sie die Säule, indem Sie 20 ml Wasser mit einer Flussrate von ca. 5 ml pro Minute hindurch laufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
8. Eluieren Sie die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1 ml einer 100%igen Methanol-Lösung und sammeln Sie dies in einem bernsteinfarbenen Glasgefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
9. Lassen Sie nach der Elution 1 ml Wasser durch die Säule laufen und sammeln sie dies im selben Gefäß, sodass es ein Gesamtvolumen von 2 ml ergibt.
10. Injizieren Sie 25 µl in das LC-MS/MS System.

LC-MS/MS-Informationen

• Probenvorbereitung – Gewürze

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

LC-MS/MS-Informationen

Vorbereitung 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 A-Stammlösung

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

Kombinierter Arbeitsstandard

1. Messen Sie 2,5 ml 100%ige Methanol-Lösung in einem bernsteinfarbenen Gefäß 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 Standards von 20 ng/ml Gesamt-Aflatoxin-Lösung und 12 ng/ml Ochratoxin A und füllen Sie mit 50%iger Methanol-Lösung 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 von 2,5 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 1,5 ng/ml Ochratoxin A und fügen Sie 1 ml 50%iger Methanol-Lösung hinzu (entspricht 1,25 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,75 ng/ml Ochratoxin A).
3. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml von 1,25 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,75 ng/ml Ochratoxin A und fügen Sie 1 ml 50%iger Methanol-Lösung hinzu (entspricht 0,625 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,375 ng/ml Ochratoxin A).
4. Standard 1: Nehmen Sie 800 µl von 0,625 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,375 ng/ml Ochratoxin A und füllen Sie mit 50%iger Methanol-Lösung auf 2 ml auf (entspricht 0,25 ng/ml Gesamt-Aflatoxin und 0,15 ng/ml Ochratoxin A).
5. 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-Informationen

• Empfohlene LC-MS/MS-Bedingungen

LC-Bedingungen

Analytische Trennsäule	Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 A, 150 mm x 3 mm oder gleichwertig		
Mobile Phase	Lösung A: 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in (95 : 5 v/v) Wasser : Methanol Lösung B: 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in (2 : 98 v/v) Wasser : Methanol 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

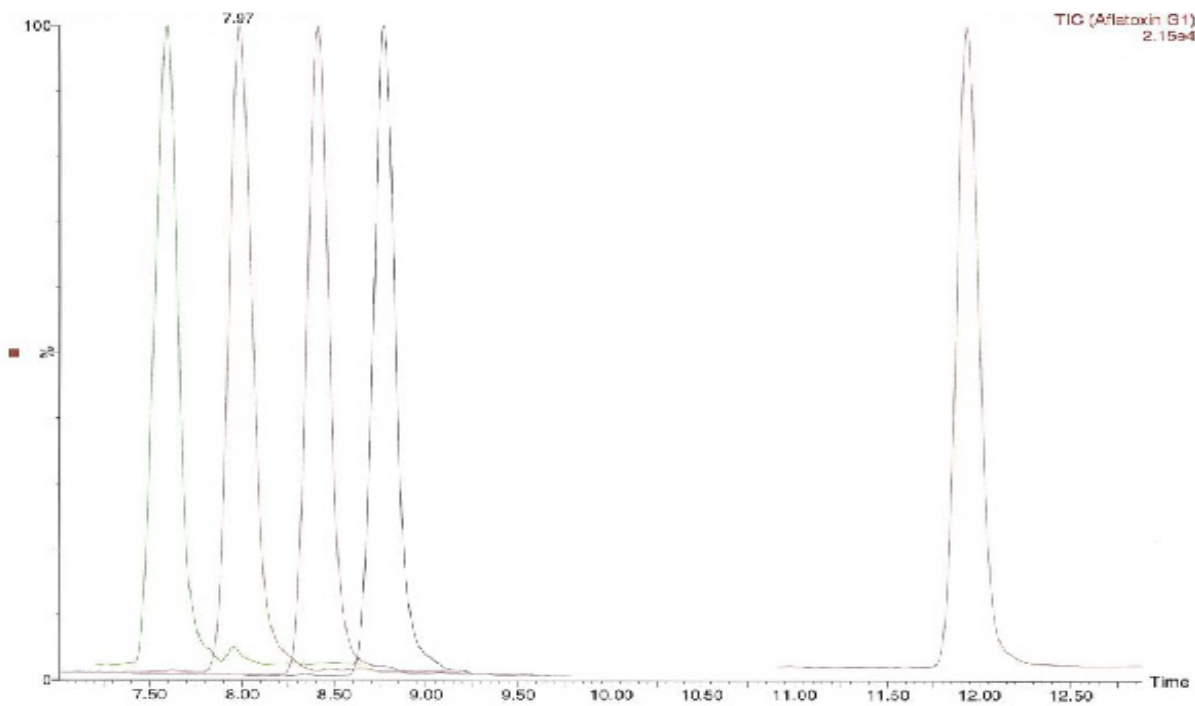
Gerät	Waters® ACQUITY TQ Detektor mit Elektrospray-Ionisierung
Modus	Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus mit positiver Polarität
Kapillarspannung	+0,64 KV
Quellentemperatur	150 °C
Desolvatationsgastemperatur	350 °C
Desolvatationsgasfluss	800 L/h (N)
Flussrate des Conegases	50 L/h (N)

Geräteeinstellung

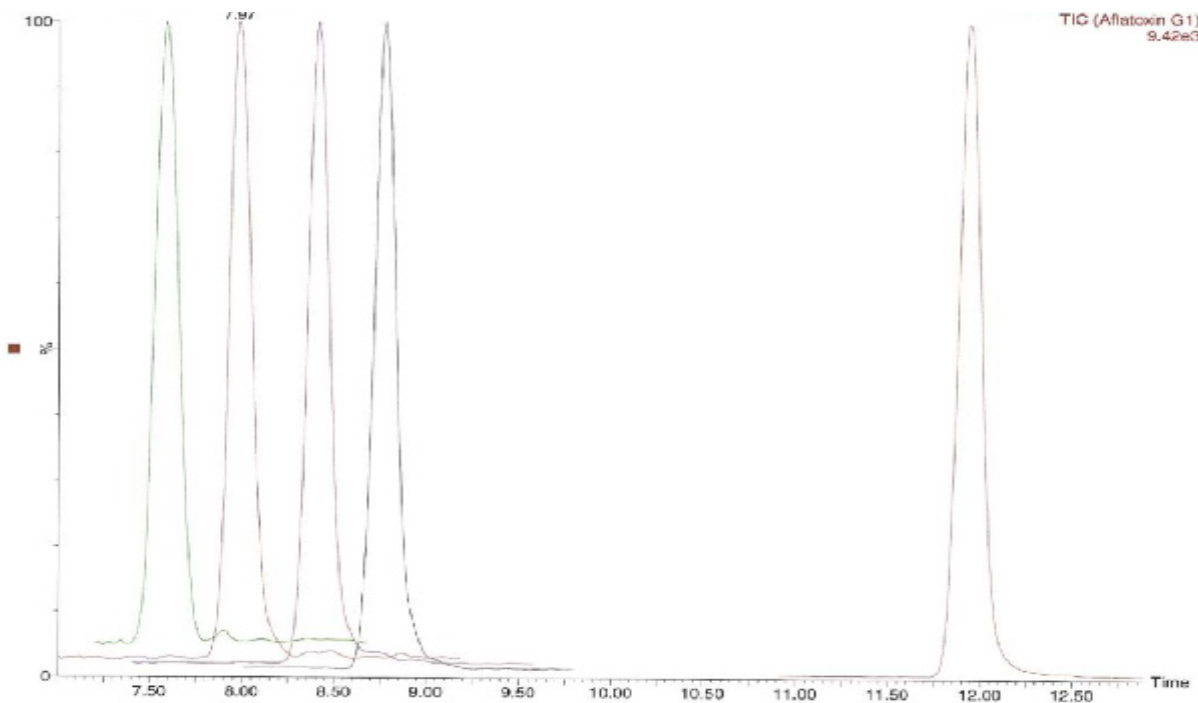
Toxin	Zeitsegment (min)	Vorläufer-Ion (m/z)	Produktionen (m/z)	Verweilzeit (s)	Konusspannung (V)	Kollisionsspannung (eV)
AFT G2	7,81	330,9 [M+H] ⁺	245,13 (Quantifizierer) 189,07 (Qualifizierer)	0,102	54 54	32 42
AFT G1	8,21	328,9 [M+H] ⁺	243,06 (Quantifizierer) 199,88 (Qualifizierer)	0,102	52 52	28 42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

LC-MS/MS-Informationen – Typische Chromatogramme

- Beispiel für ein LC-MS/MS-Chromatogramm für Mais (mit Dotierung bei 10 ppb Gesamt-Aflatoxin und 5 ppb Ochratoxin)



- Beispiel für ein LC-MS/MS-Chromatogramm für Paprika (mit Dotierung bei 10 ppb Gesamt-Aflatoxin und 40 ppb Ochratoxin)



Qualität

RBR-Produkte werden unter einem gemäß ISO 9001 registrierten Qualitätsmanagementsystem entwickelt, gefertigt, getestet und geliefert, was ein konsistentes Produkt garantiert, das immer Ihren Leistungsdaten entspricht. Unsere Produkte wurden in mehreren Ringversuchen zur Entwicklung europäischer und internationaler Standardmethoden verwenden und in großem Umfang von wichtigen Einrichtungen, Lebensmittelunternehmen und staatlichen Labors eingesetzt. Kundenreferenzen für RBR-Produkte 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 Services:

- 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 gibt keine Garantien jeglicher Art, 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 besonderen 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