

RIDA[®] Aflatoxin column

Immunaффinitätssäulen für die Probenvorbereitung
zum Nachweis von Aflatoxin

Immunoaffinity column for sample clean up prior to
analysis of aflatoxin

Art. No.: R5001

Art. No.: R5002

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

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

Anschrift:

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

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

Telefax / E-Mail:

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

Marketing

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

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDA® Aflatoxin column (Art. Nr.: R5001 / R5002) sind Immunaффinitätssäulen für die Probenvorbereitung vor dem Nachweis der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ in Lebens- und Futtermitteln.

Insbesondere sind die Säulen für die Probenvorbereitung von schwierigen Proben wie Nüssen, Kräutern, Gewürzen und Teeblättern geeignet.

R5001 enthält 10 Immunaффinitätssäulen für den einmaligen Gebrauch.

R5002 enthält 50 Immunaффinitätssäulen für den einmaligen Gebrauch.

Gelmatrix:	Sepharose
Antikörper:	an Sepharose gekoppelte monoklonale Antikörper
Flussrate:	1 Tropfen/sec
Nachweisgrenze: (bezogen auf die Standardsubstanz)	abhängig von der aufgetragenen Probenmenge und der Nachweismethode (z. B. für Kräuter, Gewürze und Teeblätter) mit anschließender Analyse im RIDASCREEN® Aflatoxin Total-Test ca. 250 ng/kg (ppt)
Säulenkapazität:	ca. 40 ng Aflatoxin
Wiederfindungsrate:	70 - 110 %

1. Allgemeines

Die RIDA® Aflatoxin column können in Kombination mit dem Enzymimmunoassay RIDASCREEN® Aflatoxin Total (R4701) zur quantitativen Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ eingesetzt werden.

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

2. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion.

Die Säule enthält eine Gel-Suspension, an die monoklonale Antikörper spezifisch für Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ kovalent gebunden sind.

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

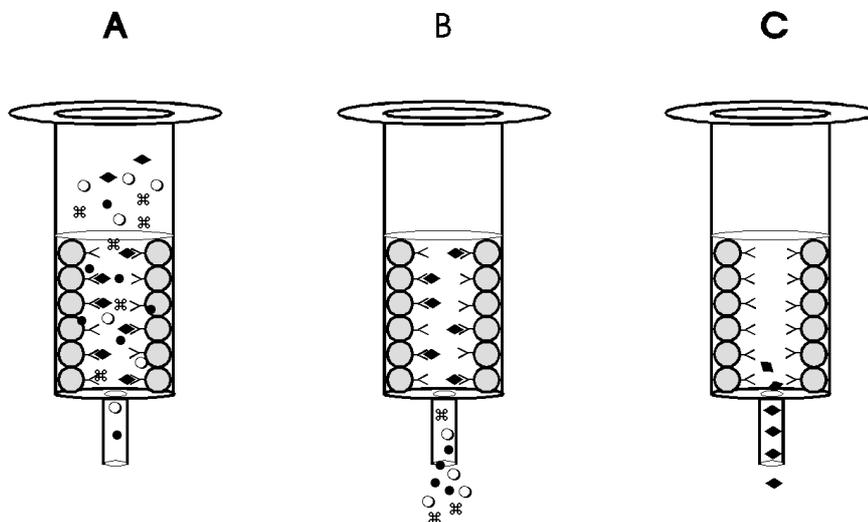


Abb. 1: Prinzip einer Immunaffinitätssäule

3. Packungsinhalt

Mit den Immunaффinitätssäulen können 10 bzw. 50 Probenaufarbeitungen durchgeführt werden (pro Säule eine Probenaufarbeitung). Jeder Testkit enthält:

10 bzw. 50 x Immunaффinitätssäulen

4. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

4.1. Geräte

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

4.2. Reagenzien

- Methanol
- Tween 20
- dest. / deionisiertes Wasser

5. Vorsichtsmaßnahmen

Die Säulen sind nur von geschultem Laborpersonal einzusetzen. Die Gebrauchsanweisung zur Anwendung ist strikt einzuhalten.

Aflatoxine sind toxische und krebserregende Substanzen. Vorsicht ist geboten. Hautkontakt vermeiden (Handschuhe tragen).

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

6. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

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

7. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Aflatoxine sind lichtempfindliche Substanzen, deshalb die Proben und die Probenextrakte vor direkter Lichteinwirkung schützen.

In den folgenden Extraktionsvorschriften (7.1. und 7.2.) wird eine Extraktmenge, die 1 g Probe entspricht, auf die Säule aufgetragen. Durch Variieren dieser Menge kann die Nachweisgrenze in Abhängigkeit von der Analysenmethode erhöht oder erniedrigt werden.

7.1. Futtermittel und Nüsse

- 5 g der gemahlten Probe mit 25 ml Methanol (70 %) versetzen
- 10 min durch Mischen (Magnetrührer) oder leichtes Schütteln extrahieren
- den Extrakt durch einen Papierfaltenfilter filtrieren
- 15 ml dest. Wasser zu 5 ml Filtrat geben
- die so vorbereitete Probelösung (= 20 ml) vollständig auf die Säule auftragen

7.2. Kräuter, Gewürze und Teeblätter

- 5 g der gemahlten Probe mit 25 ml Methanol (70 %) versetzen
- 10 min durch Mischen (Magnetrührer) oder leichtes Schütteln extrahieren
- den Extrakt durch einen Papierfaltenfilter filtrieren
- 15 ml dest. Wasser zu 5 ml Filtrat geben
- diese Lösung mit 0,25 ml Tween 20 versetzen und 2 min rühren
- die so vorbereitete Probelösung (ca. 20 ml) vollständig auf die Säule auftragen

Anmerkung:

Auf Anfrage ist eine weitere Applikation für Rohkaffee zum Nachweis mit dem RIDASCREEN® Aflatoxin Total (R4701) erhältlich.

8. Reinigung mit RIDA® Aflatoxin column

8.1. Testvorbereitungen

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

Die Säulen werden ohne Adapter für das Probenreservoir geliefert.

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

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

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

8.2. Durchführung

Die Säulen nicht trocken laufen lassen!

1. die Säule mit 2 ml dest. Wasser waschen
2. die Säule mit ca. 1 ml vorbereiteter Probelösung füllen
3. einen passenden Adapter auf das obere Ende der Säule aufstecken und eine Einmal-Kunststoffspritze als Probenreservoir aufstecken
4. die restliche Probelösung in das Reservoir füllen
5. die Probelösung langsam und gleichmäßig durch die Säule drücken (Flussrate: ca. 1 Tropfen/sec) bzw. bei Gebrauch eines Vakuumextraktionsgerätes durch die Säule saugen
6. den Durchlauf verwerfen
7. die Säule mit 10 ml dest. Wasser waschen
8. den Durchlauf verwerfen
9. die Flüssigkeitsreste gründlich durch Nachdrücken von Luft bzw. durch Anlegen von leichtem Vakuum (ca. 10 sec) entfernen
10. Probenreservoir entfernen und ein sauberes, verschließbares Auffanggefäß unter die Säule stellen

11. mit 0,5 ml Methanol (100 %) **langsam** eluieren (Flussrate: ca. 1 Tropfen/sec), um sicherzustellen, dass das gesamte Toxin von den Antikörpern gelöst wird
12. bei zu schneller Passage (schneller als 10 sec) wird das Eluat aufgenommen und nochmals auf die Säule aufgetragen
13. Eluatreste durch Nachdrücken von Luft bzw. durch Absaugen aus der Säule gewinnen (30 sec)
14. Nachweis im RIDASCREEN® Aflatoxin Total (siehe 9.1.)

9. Nachweis und Quantifizierung

9.1. RIDASCREEN® Aflatoxin Total (R4701)

- das toxinhaltige Eluat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 50 µl + 450 µl dest. Wasser)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

Bitte beachten:

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

Wird, wie unter 7.1. bzw. 7.2. angegeben, der 1 g entsprechende Extrakt auf die Säule aufgetragen, resultiert daraus der Verdünnungsfaktor **5**. Der Messbereich der Standardkurve des RIDASCREEN® Aflatoxin Total-Test liegt dann zwischen 0,250 und 20,25 µg/kg (ppb); Nachweisgrenze: 0,250 ppb.

Bei hohen Aflatoxingehalten in der Probe sind weitere Verdünnungsschritte notwendig. Hierzu muss dest. Wasser mit 10 % Methanol verwendet werden. (z. B. 9 ml dest. Wasser + 1 ml Methanol (100 %)).

Alle Proben müssen in dest. Wasser mit 10%igem Methanolanteil in den RIDASCREEN® Aflatoxin Total-Test eingesetzt werden!

Soll die Nachweisgrenze erhöht werden, wird der einem Vielfachen von 1 g entsprechende Extrakt auf die Säule aufgetragen. Der Verdünnungsfaktor beträgt z. B. bei 2 g Extrakt **2,5** und bei 4 g Extrakt **1,25**. Entsprechend ändern sich der Messbereich der Standardkurve und die Nachweisgrenze!

Hinweise zur Aufbewahrung von Proben und Probenextrakten

1. Die Proben sollten stets kühl, trocken, lichtgeschützt und gut verschlossen aufbewahrt werden.
2. Methanol-Eluate: lichtgeschützt und eingefroren können diese Eluate für zwei bis drei Monate gelagert werden.

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

RIDA[®] Aflatoxin column

Brief information

RIDA[®] Aflatoxin column (Art. No.: R5001 / R5002) are immunoaffinity columns for sample clean up prior to analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in food and feed. The columns are particularly suited for the clean up of difficult samples such as nuts, herbs, spices and tea leaves.

R5001 contains 10 immunoaffinity columns for single use.

R5002 contains 50 immunoaffinity columns for single use.

Gel suspension:	Sepharose
Antibody:	monoclonal antibody conjugated to Sepharose
Flow rate:	1 drop/sec
Detection limit: (corresponding to the standard substance)	depending on sample volume applied and on detection method (e. g. for herbs, spices and tea leaves) analysed by RIDASCREEN [®] Aflatoxin Total approx. 250 ng/kg (ppt)
Capacity of the column:	approx. 40 ng aflatoxin
Recovery rate:	approx. 70 - 110 %

1. General

The RIDA[®] Aflatoxin columns are usable in combination with the enzyme immunoassay RIDASCREEN[®] Aflatoxin Total (R4701) for the quantitative determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂.

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

2. Test principle

The basis is the antigen-antibody reaction.

The column contains a gel suspension to which monoclonal antibodies are attached covalently. The antibodies are specific for the aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂.

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

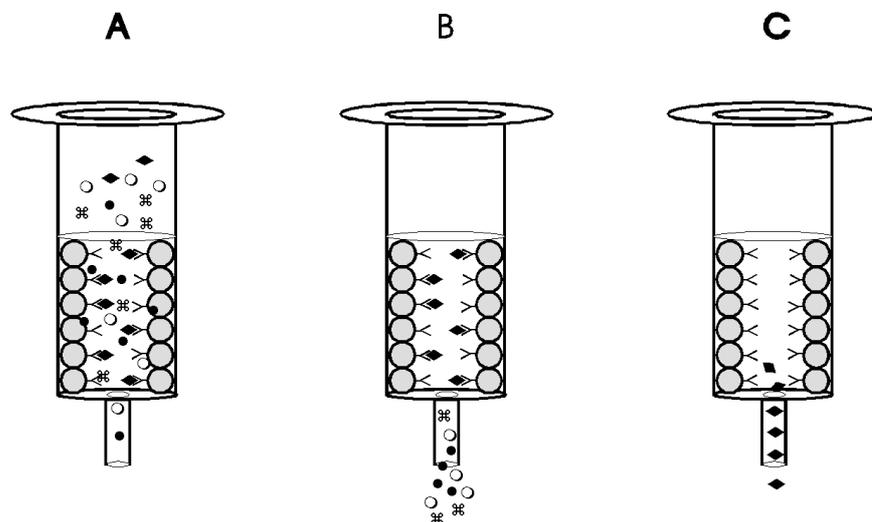


Fig. 1: Principle of an immunoaffinity column

3. Reagents provided

With the immunoaffinity columns 10 or 50 sample preparations respectively can be done (one sample preparation per column). Each test kit contains:

10 or 50 x immunoaffinity columns

4. Material required but not provided

4.1. Equipment

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

4.2. Reagents

- methanol
- tween 20
- distilled / deionized water

5. Warnings and precautions for the users

The columns should only be used by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

Aflatoxins are toxic and carcinogenic substances. Particular care should be taken. Avoid contact of the sample or sample extract with the skin (use gloves).

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

6. Storage instructions

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

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

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

7. Preparation of samples

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

Aflatoxins are light sensitive, therefore, avoid exposure of the samples and sample extracts to direct light.

With the extraction protocols (7.1. and 7.2.) given in the following pages the actual volume of sample passed through the column is equivalent to 1 g of starting commodity. The detection limit depending on the analytical method can be increased or decreased in variation of this amount.

7.1. Feed and nuts

- add 5 g of ground sample to 25 ml methanol (70 %)
- extract by mixing (magnetic stirrer) or soft shaking over a 10 min period
- filter the extract through a fluted paper filter
- add 15 ml distilled water to 5 ml of the filtered solution
- pass the entire amount (= 20 ml) of the sample solution over the column

7.2. Herbs, spices and tea leaves

- add 5 g of ground sample to 25 ml methanol (70 %)
- extract by mixing (magnetic stirrer) or soft shaking over a 10 min period
- filter the extract through a fluted paper filter
- add 15 ml distilled water to 5 ml of the filtered solution
- add 0.25 ml Tween 20 and stir for 2 min
- pass the entire amount (approx. 20 ml) of the sample solution over the column

Remark:

An additional application note for green coffee for analysis with the RIDASCREEN® Aflatoxin Total (R4701) is available on request. Please contact your local distributor.

8. Separation with RIDA® Aflatoxin column

8.1. Preliminary comments

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

The columns are delivered without an adapter for sample reservoir.

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

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

Excessive pressure on the column or extreme vacuum in the vacuum unit may cause compression of the gel and consequently low recoveries.

8.2. Clean up

Do not let the columns dry up!

1. rinse the column with 2 ml distilled water
2. fill the column with approx. 1 ml prepared sample solution
3. attach suitable adapter on top of the column and use syringe as sample reservoir
4. fill syringe with the residual sample solution
5. pass sample extract slowly and continuously through the column (flow rate: approx. 1 drop/sec), use positive pressure with syringe or absorb when using vacuum unit
6. discard the passed solution
7. rinse the column with 10 ml distilled water
8. discard the passed solution
9. press some air through the column respectively absorb with light vacuum (approx. 10 sec) to make sure that all the residual fluids will be removed from the column

10. remove syringe and place a clean and closable vial directly below the column
11. elute with 0.5 ml methanol (100 %); methanol has to pass **slowly** through the column (flow rate: approx. 1 drop/sec) to ensure complete elution of the aflatoxins
12. if the eluent passed too fast (faster than 10 sec), collect the eluate and pass it again through the column
13. collect all eluate residues by pressing air thoroughly through the column or absorb with vacuum for 30 sec
14. detection with RIDASCREEN[®] Aflatoxin Total (see 9.1.)

9. Detection and quantification

9.1. RIDASCREEN[®] Aflatoxin Total (R4701)

- dilute the toxin containing eluate 1:10 (1+9) with distilled water (e. g. 50 µl + 450 µl distilled water)
- use 50 µl per well in the assay

Please note:

In order to obtain the aflatoxin concentration actually contained in a sample the concentration read from the calibration curve has to be multiplied by the corresponding dilution factor.

When working in accordance with the protocol given in 7.1. and 7.2. the resulting dilution factor is **5**. The measuring range of the standard curve for the RIDASCREEN[®] Aflatoxin Total kit is then between 0.250 and 20.25 µg/kg (ppb); detection limit: 0.250 ppb.

In case of high aflatoxin content in the sample further dilution steps are necessary. This dilution has to be done with distilled water containing 10 % methanol. (e.g. 9 ml dest. Wasser + 1 ml Methanol (100 %)).

All samples have to be diluted in distilled water with 10 % methanol for use in the RIDASCREEN[®] Aflatoxin Total test.

To improve the detection limit pass a volume of the extract corresponding to more than 1 g through the column. E.g. for 2 g of extract the dilution factor is **2.5** and for 4 g of extract **1.25**. The measuring range and the detection limit of the kit vary correspondingly.

Remarks for storage of samples and sample extracts:

1. Original samples should always be kept refrigerated, dry, protected against light and well sealed.
2. Methanolic eluates: Store the eluate in a cool place protected against light. Under frozen and protected conditions the eluate can be stored for 2 to 3 months.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.