

AFLAPREP®

产品编号: RBRP07

免疫亲和柱，配合 HPLC 高效液相色谱或 LC-MS/MS 串联质谱使用。
仅用于体外使用

P07/V21/03.03.17

www.r-biopharm.com



检测原理	3
另需但盒中不提供的材料	3
附件包	3
建议方法和应用指南	3
危害	3
净化处理	4
储存条件 & 保质期	4
取样	4
灵敏度	4
回收率	4
亲和柱操作准备	4
反冲洗	5
可提供的应用范围	5
样品处理	6
• 谷物	6
• 坚果	7
制备标准品	7
校准曲线	8
推荐的 HPLC 操作条件	9
使用 AFLAPREP® 黄曲霉毒素免疫亲和柱分析检测黄曲霉毒素的典型 HPLC 谱图	10
• 谷物	10
• 坚果	10
质量保证	11
技术支持	11
担保书	11

检测原理

检测方法是基于单克隆抗体技术，这使得检测具有高特异性、高灵敏度、快速和简单易操作的特点。

亲和柱中含有针对目标毒素的高特异性单克隆抗体凝胶悬浮液。进行样品提取后，过滤样品提取液，稀释，然后缓慢通过免疫亲和柱。样品中存在的毒素与凝胶悬浮液中的抗体结合。洗涤柱子除去未结合的物质，然后用溶剂洗脱，从柱子中释放出目标毒素。收集洗脱液用于进行 HPLC 或 LC-MS/MS 检测。若使用 HPLC 检测黄曲霉毒素，需要进行衍生。

提取和净化所需的总时间约为 20 分钟。这样改善了净化效果，浓缩了食品和饲料样品中的毒素，获得更纯净的色谱峰，因此提供了更精确和灵敏的检测结果。亲和柱还有另一个优势，可以用于大量样品的自动化分析。

另需但盒中不提供的材料

- 蒸馏水/去离子水（配合 HPLC 使用，例如 MilliQ）
- 溶剂（色谱级甲醇）
- 磷酸盐缓冲液（PBS）（产品编号：RP202）*
- 黄曲霉毒素标准品（请参考“制备标准品”部分）
- 氯化钠
- 氢氧化钠（如果需要，用于调节 pH）
- 硝酸（使用 KOBRA® CELL 电化学衍生池衍生时需要）
- 溴化钾（使用 KOBRA® CELL 电化学衍生池衍生时需要）

附件包

- Whatman NO.113 号滤纸或 NO.4 号滤纸（产品编号：P66 和 P67）*
- KOBRA® CELL 电化学衍生池 (K01)*
- 免疫亲和柱架 (CR1)*
- 免疫亲和柱附件包 (AP01)*

* 产品可以从 R-Biopharm 德国拜发公司订购。请联系当地的拜发分公司获取更多的信息。

建议方法和应用指南

我们为您提供所有法规要求检测的样品基质包括其他相关补充样品基质的样品处理方法。实际操作中存在的与说明书方法的差异可能导致无法得到最理想的检测结果。欢迎联系德国拜发 R-Biopharm 集团当地供应商了解详情。

危害

霉菌毒素为剧毒物质。只有配备有处理有毒物质和溶液设备的实验室才能进行毒素检测。在检测过程中应配备合适的防护服，包括橡胶手套，护目镜和实验服。

易燃溶剂应存放在防爆柜中。使用化学面罩和防护设备。

柱中含有 0.01 % (w/v) 硫柳汞。如溅射到眼睛或皮肤应立即使用大量水冲洗。如果需要，联系当地的 R-Biopharm 德国拜发公司经销商获得材料安全数据表以了解更多信息。

净化处理

过量的标准品溶液应采用 **5 %** 次氯酸钠处理，用量至少为所剩溶液量的十分之一。实验室器具和污染的废液必须浸泡在 **5 %** 的次氯酸钠溶液净化消毒至少 **30** 分钟，然后再加入 **5 %** 丙酮继续浸泡 **30** 分钟。在每次操作前用大量水冲洗。净化实验器具后，应彻底用水冲洗干净。如果法规允许，可焚烧废物。

储存条件 & 保质期

自生产之日起，柱子可在 **2 - 8 °C** 条件下保存 **18** 个月或在 **21 - 25 °C** 条件下保存 **12** 个月。不可冷冻。

确保柱子不要干燥，缓冲液的液面没过凝胶。需要注意的是，在极端温度或 **pH** 变化情况下，会导致免疫亲和柱内的抗体变性。

取样

一个有代表性的样品，应当按照官方认可的样品处理方法进行处理而获得，推荐最少粉碎 **1 kg** 具有代表性的样品，然后取部分（根据所使用的方法取 **10 - 50 g**）粉碎后的样品进行分析、提取。

灵敏度

灵敏度取决于最终使用的检测分析系统。但如果必要，可以采用增加过柱样品量的方法改善检测灵敏度。请注意溶剂与磷酸盐缓冲液（**PBS**）的比例应该保持不变。

回收率

如果想计算在提取过程中的损失，推荐做添加回收试验。选择与被测试样品相同材料的参照品作为参考标准，并完全按照要求处理此样品。用参照品计算所得的回收率可以用于校准所测样品的结果。

亲和柱操作准备

免疫亲和柱使用前应回至室温。

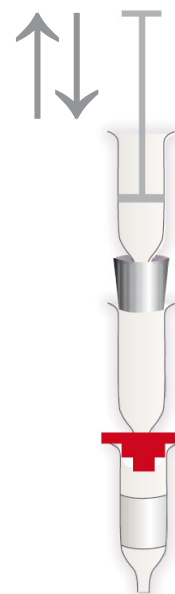
在凝胶和隔层之间存在一个空间是正常的。有时，在运输过程中，这里可能形成气泡。如果发生这种情况，可以轻拍亲和柱的底部去除气泡。

取下并丢弃柱顶端的盖子。将亲和柱与玻璃注射器用适配器紧密连接，置于免疫亲和柱支架或固定支座上。



反冲洗

反冲洗可增加洗脱液与柱内凝胶中抗体接触的时间以确保毒素全部被洗脱下来。当洗脱液通过亲和柱时，缓慢上下抽动注射器活塞进行反冲洗。这个过程使洗脱液倒流，重复此操作 3 次。



可提供的应用范围

法规中其他商品所包括的所有基质的检测方法均可提供。进一步的信息请联系当地 **R-Biopharm** 德国拜发公司获取。

样品处理

• 谷物

这种方法检测过大量的谷物样品，其中包括小麦、大麦和玉米。

1. 称取 50 g 粉末样品和 5 g 氯化钠于 1 升的耐溶剂的搅拌器中。
2. 加入 100 ml 80 % 的甲醇，高速搅拌 2 分钟。
3. 用 Whatman 4 号滤纸或 113 号滤纸过滤样品，或 4000 rpm 条件下离心 10 分钟。
4. 用 14 ml 的磷酸盐缓冲液（PBS）稀释 2 ml 的滤液。
5. 取全部滤液（相当于 1 g 样品）通过免疫亲和柱，流速为 2 ml/min (或者以重力下的自然速度使样品通过亲和柱)。缓慢、稳定的流速对于抗体捕获毒素是必不可少的。
6. 用 20 ml PBS 缓冲液以 5 ml/min 的流速洗涤柱子。加压吹干柱子确保残余液体流出。
7. 用 1 ml 100 % 的甲醇以每秒一滴的流速将毒素从柱子上缓慢洗脱，将洗脱液收集于的琥珀色玻璃瓶中。建议进行反冲洗操作。具体信息请参考“反冲洗部分”。
8. 洗脱后，取 1 ml 蒸馏水过柱，收集到相同的玻璃瓶中，总体积为 2 ml。
9. 取 100 μ l 注入 HPLC 系统中进行分析。

样品处理

• 坚果

这种方法检测过大量的坚果样品，其中包括开心果、花生、杏仁、巴西坚果和核桃。

1. 称取 50 g 粉末样品和 5 g 氯化钠于 1 升的耐溶剂的搅拌器中。
2. 加入 100 ml 蒸馏水，高速搅拌 1 分钟。
3. 加入 150 ml 100 % 的甲醇，再次高速搅拌 2 分钟。
4. 用 Whatman 4 号滤纸或 113 号滤纸过滤样品，或 4000 rpm 条件下离心 10 分钟。
5. 用 2 M 氢氧化钠溶液调整 pH 至 7.4 左右。
6. 用 5 ml 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释 5 ml 的滤液。
7. 取稀释后的滤液（相当于 1 g 样品）通过免疫亲和柱，流速为 2 ml/min(或者以重力下的自然速度使样品通过亲和柱)。缓慢、稳定的流速对于抗体捕获毒素是必不可少的。
8. 用 20 ml PBS 缓冲液以 5 ml/min 的流速洗涤柱子。加压吹干柱子确保残余液体流出。
9. 用 1 ml 100 % 的甲醇以每秒一滴的流速将毒素从柱子上缓慢洗脱，将洗脱液收集于的琥珀色玻璃瓶中。建议进行反冲洗操作。具体信息请参考“反冲洗部分”。
10. 洗脱后，取 1 ml 蒸馏水过柱，收集到相同的玻璃瓶中，总体积为 2 ml。
11. 取 100 μ l 注入 HPLC 系统中进行分析。

制备标准品

制备 1000 ng/ml 的总黄曲霉毒素标准品溶液:

1. R-Biopharm 德国拜发公司可提供即用型黄曲霉毒素标准品溶液 AFLASTANDARD (P22 / P22A, 1000 ng/ml)。

或者

1. 或者, 可以从拜发公司购买黄曲霉毒素 B1, B2, G1 和 G2 晶体粉末, 请联系当地的拜发公司获得更多信息。按照说明书重新溶解粉末, 室温条件下暗处放置过夜即得到储备液。
2. 然后用其来制备 1000 ng/ml 的黄曲霉毒素总量标准品溶液。

注意每个标准品的 B1, B2, G1 和 G2 的比例可能不同。请购买正确配比的标准品。

校准曲线

建议绘制至少 3 - 6 个点的校准曲线。为建立合适的标准曲线, 校准标准品的水平应等于或包含预期结果的可能范围。稀释的标准品溶液应在检测的当天新鲜配置, 并且在 24 小时内使用。

绘制一条 4 个点的校准曲线

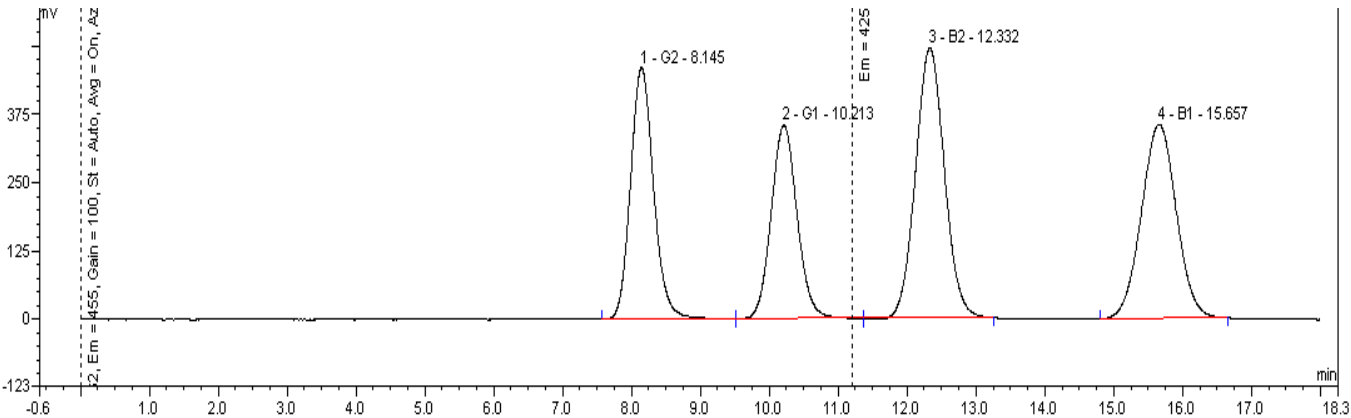
1. 标准品 4: 取 80 μ l 1000 ng/ml 的总黄曲霉毒素标准品溶液, 加入 50 % 的甲醇溶液至 2 ml (相当于 40 ng/ml 的标准品溶液)。
2. 标准品 3: 取 1 ml 40 ng/ml 的标准品溶液, 加入 1 ml 50 % 的甲醇溶液 (相当于浓度为 20 ng/ml 的标准品溶液)。
3. 标准品 2: 取 1 ml 20 ng/ml 的标准品溶液, 加入 1 ml 50 % 的甲醇溶液 (相当于浓度为 10 ng/ml 的标准品溶液)。
4. 标准品 1: 取 400 μ l 10 ng/ml 的标准品溶液, 加入 50 % 的甲醇溶液至 2 ml (相当于浓度为 2 ng/ml 的标准品溶液)。
5. 取 100 μ l 每种溶液注入 HPLC 系统。用 KOBRA® CELL 衍生, 洗脱顺序为 G2, G1, B2 和 B1。

推荐的 HPLC 操作条件

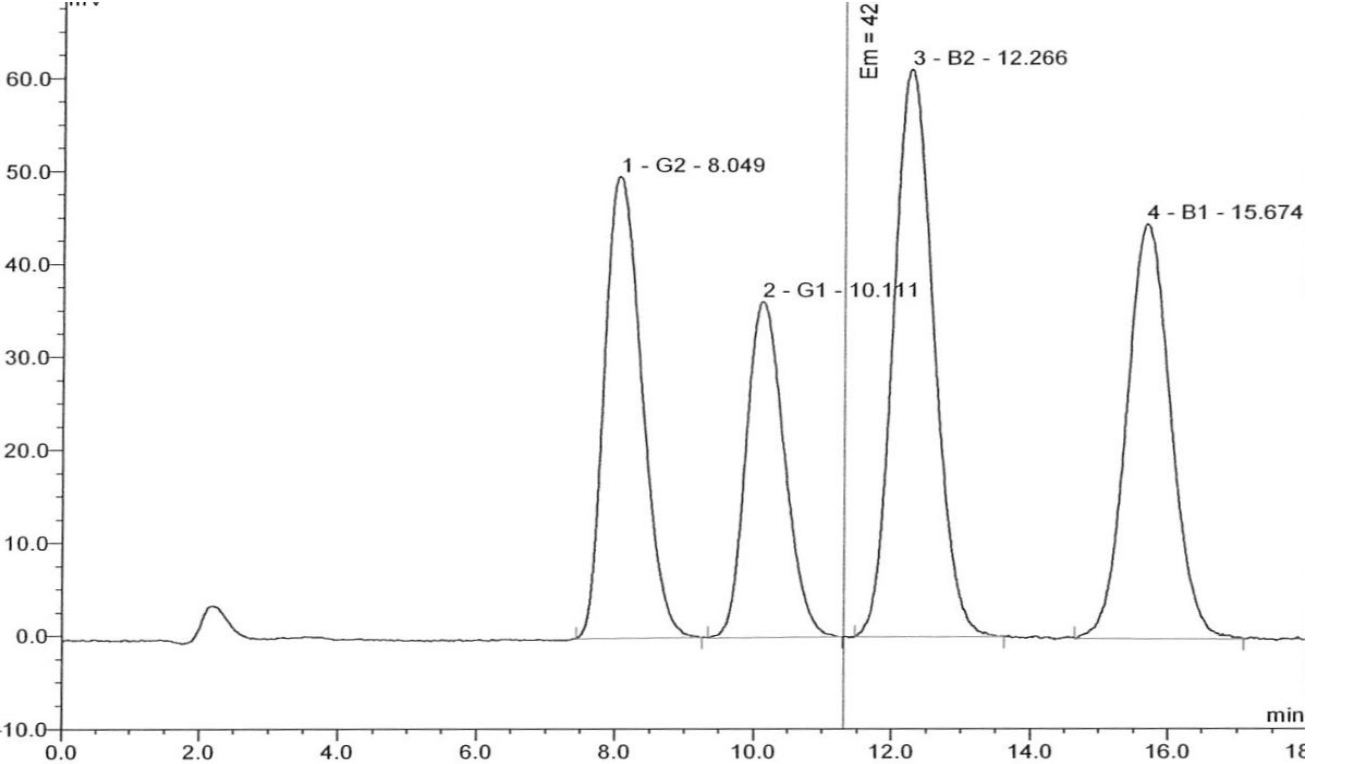
HPLC 条件	
衍生	KOBRA® CELL 电化学衍生池设定在 100 μ A
保护柱	Inertsil ODS-3 5 μ m, 4 mm x 10 mm (Hichrom) 或者其他等效的
分析柱	Inertsil ODS-3V 5 μ m, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) 或者其他等效的
流动相	水: 甲醇 (60 : 40 v/v)
HPLC 泵	用于传输流动相 取 119 mg 溴化钾和 350 μ l 4M 硝酸加入至 1 升的流动相A和B溶液中。检测当天新鲜配置。
流速	1.0 ml/min
荧光检测器	激发光: 362 nm
	发散光: 425 nm (B1 and B2) 455 nm (G1 and G2)
柱温	保持保护柱和分析柱为 40 °C
积分仪/数据控制系统	供应商提供
进样器	自动进样器/ Reodyne 进样阀
进样体积	100 μ l
洗脱顺序	G2, G1, B2, B1

使用 AFLAPREP® 黄曲霉毒素免疫亲和柱分析检测黄曲霉毒素的典型 HPLC 谱图

• 谷物



• 坚果



质量保证

RBR 拜发集团英国子公司的产品根据ISO 9001和ISO 13485 质量管理体系开发、制造、实验和发货，始终保持产品质量的稳定和可靠。我们的产品被应用于众多研究领域，用于开发欧洲和国际的标准检测方法。重点研究机构、食品企业和政府实验室均广泛使用我们的产品。可提供RBR 拜发集团英国子公司荣誉客户信息。

技术支持

RBR 拜发集团英国子公司深知我们的客户常需要我们的帮助和咨询。因此，我们非常高兴为您提供以下服务

- 问题样品的分析
- 难分析样品的操作指南
- RBR 拜发集团英国子公司参考资料
- KOBRA® CELL 电化学衍生池的安装和技术支持
- 检测参数的咨询
- 标准品制备和操作咨询
- 通过电子邮件更新相关法律、样品和其他信息
- 加标样品的提供

了解更多信息请联系 R-Biopharm 拜发集团当地的经销商。

担保书

R-Biopharm Rhône 拜发集团英国子公司仅对采用适合的优质材料制造的产品担保。用户应自行承担所有风险和责任。拜发公司不承担除试剂基本品质之外的任何责任。除因产品使用而造成的直接或间接损坏及损失外，其他有缺陷的试剂盒可退换。

生产商：

R-Biopharm Rhône Ltd 拜发集团英国子公司
苏格兰，英国

本地运营商：

拜发分析系统销售（北京）有限公司
北京市朝阳区曙光西里甲5号凤凰置地广场F座1601
100028
北京，中国
电话：+86 -10 8458 3218
传真：+86 -10 8458 0691
info@r-biopharm.cn