AFLAPREP® M WIDE

Produktcode: P124 / P124B

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

P124/V7/30.06.21

www.r-biopharm.com

R-BIOPHARM RHÔNE LTD

Inhalt

Seite

Testprinzip ... 4
Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien ... 4
Zubehörprodukte ... 4
Gefahren ... 4
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise ... 4
Dekontamination ... 5
Lagerung und Haltbarkeit ... 5
Probennahme ... 5
Sensitivität ... 5
Wiederfindung ... 5
Säulenvorbereitung ... 5
Elution ... 6
Vorbereitung der Probe ... 7
- Milch ... 7
- Milchpulver ... 8

Vorbereitung von Standards ... 9
Kalibrierkurve ... 9
Empfohlene HPLC-Bedingungen ... 10
Typische HPLC-Chromatogramme von Milch (gespiked mit 0.05 ppb) ... 11
Typische HPLC-Chromatogramme von Milchpulver (gespiked mit 0.05 ppb) ... 11
Qualität ... 12
Technische Unterstützung ... 12
Garantie ... 12

Testprinzip

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

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch für das jeweilige Toxin ist. Die Probe wird gefiltert und langsam durch die Immunaffinitätssäule geleitet. Die in der Probe vorhandenen Toxine werden von dem 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 oder LC-MS/MS-Analyse gesammelt.

Die Extraktion und Reinigung dauert insgesamt ca. 30 Minuten. Das Ergebnis ist eine verbesserte Reinigung und Konzentration des Toxins aus Lebensmittel und Futtermitteln, wodurch man ein verbessertes Chromatogramm und somit eine genauere und sensitivere Detektion erhält. Die Säulen haben außerdem den Vorteil, dass sie für eine große Anzahl von Proben automatisiert werden können.

Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

- Destilliertes / deionisiertes Wasser (geeignet für die HPLC, z. B. MilliQ)
- Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril /HPLC-Qualität)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (RBRRP202)*
- Aflatoxin M1-Standard (siehe Abschnitt „Vorbereitung von Standards“)

Accessory Products

- Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier
- Immunaffinitätssäulenständer (RBRCR1)*
- Immunaffinitätssäulen-Zubehörpaket (RBRAP01)*

* Erhältlich bei R-Biopharm AG.

Gefahren

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

Entzündliche Lösungsmittel müssen in einem explosionssicheren 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 Herstelldatum, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden, bzw. von 12 Monaten ab dem Herstelldatum, 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 Immunaffinitätssäule 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 Immunaffinitätssäule geleiteten Probe erhöht wird.

Wiederfindung

Wenn ein Sie Verluste während der Extraktion berücksichtigen wollen, wird empfohlen, dass eine gespikte 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 Immunaffinitätssäulen 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 Immunaffinitätssäulen- oder einen Klemmständer stellen.

Elution

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

Um sicherzustellen, dass das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper-Gel in Kontakt ist, kann eine der folgenden Elutionsmethoden verwendet werden: -

Rückspülung (bevorzugte Methode bei R-Biopharm): Die Rückspülung wird durchgeführt, indem der Spritzenkolben während des Durchlaufs des Lösungsmittels durch die Säule sanft angehoben und abgesenkt wird. Dadurch wird die Richtung des Eluatflusses durch das Gel umgekehrt. Dieser Prozess sollte vor der Sammlung des Eluats dreimal wiederholt werden. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.

Anwendung kleiner Lösungsmittelmengen: Fügen Sie die für die Elution erforderliche Lösungsmittelmenge in zwei oder drei kleineren Aliquoten hinzu. Belassen Sie jedes Aliquot mindestens 30 Sekunden lang mit der Gelsuspension in Kontakt, bevor Sie es zur Sammlung vollständig durch die Gelsuspension laufen lassen. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.

Inkubation mit Lösungsmittel: Fügen Sie die für die Elution erforderliche gesamte Lösungsmittelmenge hinzu und lassen Sie 2-3 Tropfen des Lösungsmittels zur Sammlung durch die Säule laufen. Belassen Sie den Rest des Lösungsmittels mindestens 60 Sekunden lang mit der Gelsuspension in Kontakt, bevor Sie es zur Sammlung durch die Gelsuspension laufen lassen. Fahren Sie mit dem nächsten Schritt der Methode fort.

Vorbereitung der Probe

• Milch

Diese Methode wurde an einer Reihe von Milchprodukten getestet, mit inbegriffen waren Kuhmilch, Ziegenmilch, Soyamilch und Sahne.

1. 100 ml Probe in einem Glasbecher abmessen und auf etwa 35 - 37 °C erhitzen.

2. Die Probe filtrieren (z. B. mit Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder bei 4.000 U/min 10 Minuten lang zentrifugieren.

3. 50 ml des Filtrats mit einer Flussrate von 2 ml/min durch die Säule laufen lassen (oder die Probe durch Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, wenn dies bevorzugt wird). Eine langsame, stetige Flussrate ist wichtig, damit das Toxin vom Antikörper gebunden wird.

4. Die Säule mit 20 ml PBS-Puffer und einer Flussrate von etwa 5 ml/min waschen. Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.

5. Die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen/Sek mittels 1,25 ml Methanol : Acetonitril (40 : 60 v/v) eluieren und in einem Braunglasröhrchen auffangen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.

6. Nach der Elution 1,25 ml Wasser durch die Säule laufen lassen und im gleichen Röhrchen auffangen, um ein Volumen von insgesamt 2,5 ml zu erhalten.

7. 100 µl in das HPLC-System injizieren.

Vorbereitung der Probe

• Milchpulver

1. 100 ml Wasser in einem Glasbecher abmessen und auf etwa 35 - 37 °C erhitzen. 80 ml des erhitzten Wassers nehmen und zu 20 g der Probe zugeben. Gut vermischen.

2. Mit dem restlichen erhitzten Wasser bis auf 100 ml auffüllen.

3. Die Probe filtrieren (mit Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder bei 4.000 U/min 10 Minuten lang zentrifugieren.

4. 50 ml des Filtrats (äquivalent zu 10 g der Probe) mit einer Flussrate von 2 ml/min durch die Säule laufen lassen (oder die Probe durch Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, wenn dies bevorzugt wird). Eine langsame, stetige Flussrate ist wichtig, damit das Toxin vom Antikörper gebunden wird.

5. Die Säule mit 20 ml PBS-Puffer und einer Flussrate von etwa 5 ml/min waschen. Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.

6. Die Toxine aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen/Sek mittels 1,25 ml Methanol : Acetonitril (40 : 60 v/v) eluieren und in einem Braunglasröhrchen auffangen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.

7. Nach der Elution 1,25 ml Wasser durch die Säule laufen lassen und im gleichen Röhrchen auffangen, um ein Volumen von insgesamt 2,5 ml zu erhalten.

8. 100 µl in das HPLC-System injizieren.

Vorbereitung von Standards

Vorbereitung von 1.000 ng/ml Aflatoxin M1-Standardlösungen:

1. Ein kristallines Pulver von Aflatoxin M1 können Sie erwerben. Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG. Das Pulver wird gemäß der Beschreibung rekonstituiert und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen, um ein Stammkonzentrat zu ergeben.

2. Dieses wird dann verwendet, um eine 1.000 ng/ml Aflatoxin M1-Standardlösung vorzubereiten.

Kalibrierkurve

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

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

1. 1 ml von einem Methanol : Acetonitril : Wasser (20 : 30 : 50 v/v/v) Gemisch in einem Braunglasröhrchen abmessen.

2. 100 µl entfernen und entsorgen.

3. 100 µl von 1.000 ng/ml Aflatoxin M1-Standard zugeben, um eine Aflatoxin M1-Lösung von 100 ng/ml zu erhalten.

4. Standard 3: 50 µl von der 100 ng/ml Aflatoxin M1-Lösung nehmen und bis auf 2,5 ml mit Methanol : Acetonitril : Wasser (20 : 30 : 50 v/v/v) auffüllen (äquivalent zu 2 ng/ml).

5. Standard 2: 1 ml von der 2 ng/ml Lösung entnehmen und 1 ml Methanol : Acetonitril : Wasser (20 : 30 : 50 v/v/v) zugeben (äquivalent zu 1 ng/ml).

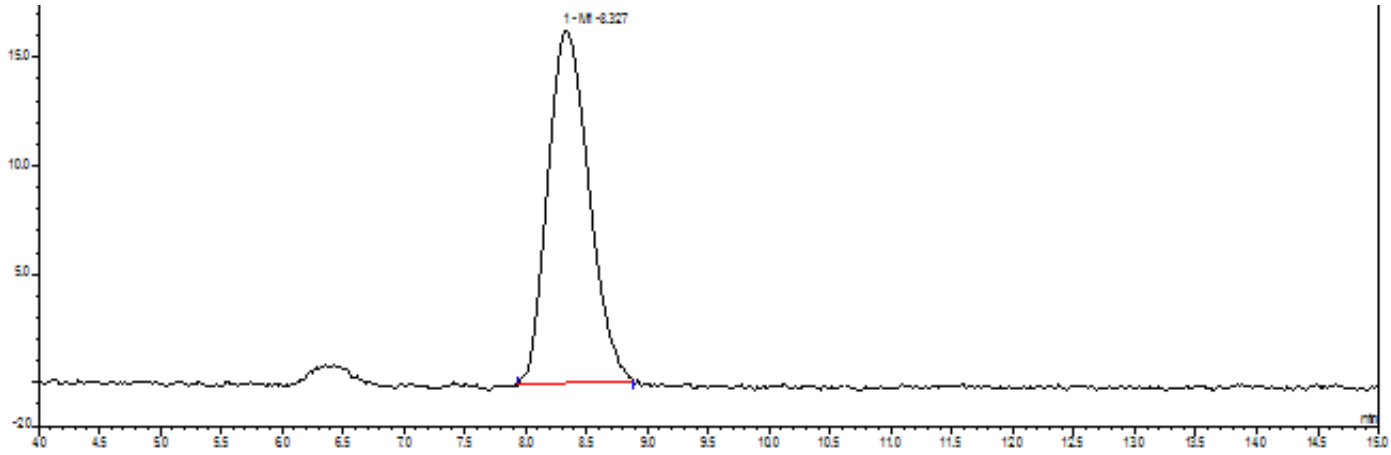
6. Standard 1: 1 ml von der 1 ng/ml Lösung entnehmen und 1 ml Methanol : Acetonitril : Wasser (20 : 30 : 50 v/v/v) zugeben (äquivalent zu 0,5 ng/ml).

7. 100 µl jeder Lösung in das HPLC-System injizieren.

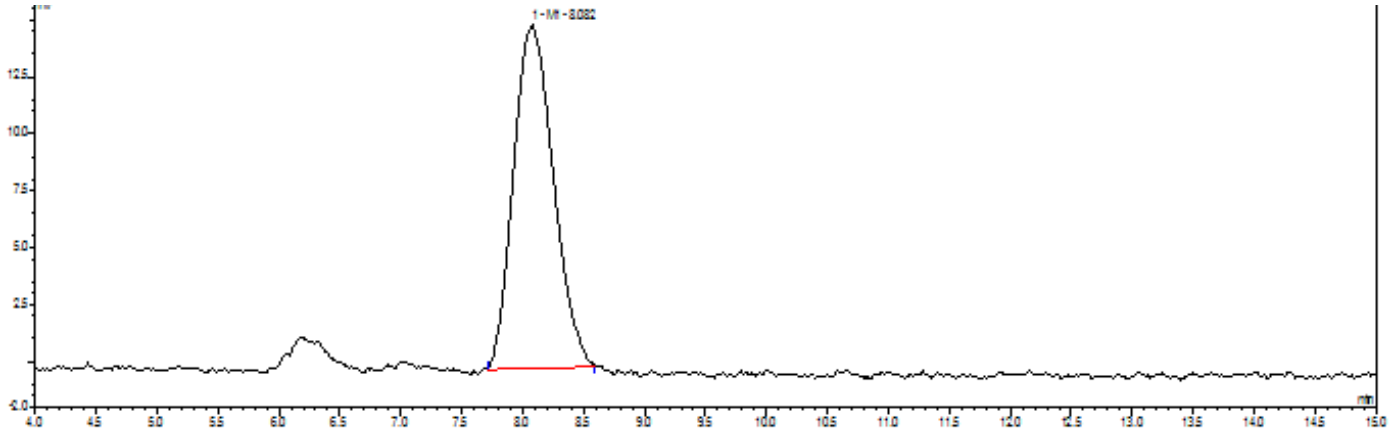
Empfohlene HPLC-Bedingungen

HPLC-Bedingungen	
Vorsäule	Inertsil ODS-3 5 µm, 4 mm x 10 mm (Hichrom) oder Äquivalent
Analytische Säule	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) oder Äquivalent
Mobile Phase	Wasser : Acetonitril : Methanol (68 : 24 : 8 v/v/v) Frisch am Tag vorbereiten.
HPLC-Pumpe	Für mobile Phase
Flussrate	1,0 ml pro Minute
Fluoreszenzdetektor	Erregung: 360 nm Emission: 430 nm
Säulenheizung	Hält die Vor- und die Analytische Säule bei 25 °C
Integrator/ Datenkontrollsystem	Von bevorzugtem Anbieter
Injektor	Autosampler / Rheodyne-Ventil
Injektionsvolumen	100 µl

Typische HPLC-Chromatogramme von Milch (gespiked mit 0.05 ppb)



Typische HPLC-Chromatogramme von Milchpulver (gespiked mit 0.05 ppb)



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