

FUMONIPREP[®]

Produktcode: DP31 / P31B

Immunoaffinitätssäulen für die Verwendung zusammen mit HPLC oder LC-MS/MS.
Nur für den In-vitro-Gebrauch.

P31/V19/27.05.22

Inhalt

	Seite
Testprinzip	4
Nicht enthaltene Reagenzien	4
Zubehörprodukte	4
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise	4
Gefahren	5
Dekontamination	5
Lagerung & Mindesthaltbarkeit	5
Probennahme	5
Sensitivität	5
Wiederfindungen	5
Säulenvorbereitung	6
Elution	6
Derivatisierung vor der HPLC-Detektion	7
• Zubereitung von 0,1 M Boratpuffer	7
• Zubereitung des OPA-Reagenzes (mit Mercaptoethanol oder 1-Thioglycerol)	7
• Programmierung des Autosamplers	7
Probenvorbereitung	8
• Getreide	8
Zubereitung von Standards	9
• Fumonisin-Stammlösung	9
Kalibrierkurve	9
Empfohlene Bedingungen für HPLC	10
Beispiel für HPLC-Chromatogramm	10
• Mais	10
Empfohlene Bedingungen für LC-MS/MS	11
Beispiel für LC-MS/MS Chromatogramm	12
• Mais	12
Qualität	13
Technischer Support	13
Garantie	13

Testprinzip

Das Verfahren basiert auf einer monoklonalen Antikörpertechnologie, die für einen äußerst spezifischen, sensitiven, schnellen und einfach durchzuführenden Test sorgt.

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension eines monoklonalen Antikörpers, der für das betreffende Toxin spezifisch ist. Nach der Extraktion der Toxine wird der Probenextrakt filtriert, verdünnt und langsam durch die Immunoaffinitätssäule geleitet. 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 vor der Analyse mittels HPLC oder LC-MS/MS gesammelt. Fumonisine müssen für die HPLC-Analyse derivatisiert werden.

Die gesamte Extraktions- und Aufreinigungszeit beträgt etwa 30 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

Für HPLC und LC-MS/MS:

- Destilliertes / deionisiertes Wasser (geeignet für die Verwendung mit HPLC, z. B. MilliQ)
- Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril in HPLC-Qualität)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (RP202)*
- Fumonisin B1 und B2 Standard (siehe Abschnitt „Zubereitung von Standards“)
- Natriumchlorid
- Natriumdihydrogenphosphat

Nur für HPLC:

- Dinatriumtetraborat
- O-Phosphorsäure (H_3PO_4) >85 %
- O-Phthaldialdehyd (OPA)
- 1-Thioglycerin

Zubehörprodukte

- Filterpapier Whatman Nr. 113 oder Nr. 4
- Glasmikrofaser-Filterpapier
- Immunoaffinitätssäulenständer (CR1)*
- Immunoaffinitätszubehörpaket (AP01)*

- * Erhältlich von R-Biopharm. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren 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.

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.

Dekontamination

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

Lagerung und 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 Puffer über dem Gel enthält. Der in der Immunoaffinitätssäule enthaltene Antikörper kann durch extreme Temperaturen oder Änderungen des pH-Werts denaturiert werden.

Probennahme

Es sollte eine repräsentative Probe durch Befolgung eines der offiziell anerkannten Probennahmeverfahren gewonnen 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 vom 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 Extraktion berücksichtigen möchte, wird empfohlen, eine dotierte Probe desselben Produkttyps 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 der Verwendung Umgebungstemperatur haben. Kappe von 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 Immunoaffinitätssäule 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.

Derivatisierung vor der HPLC-Detektion

• Zubereitung von 0,1 M Boratpuffer

Der Puffer sollte am Tag der Analyse frisch zubereitet werden.

1. Wiegen Sie 3,8 g Natriumtetraborat in ein Glasgefäß ab.
2. Mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

• Zubereitung des OPA-Reagenzes (mit Mercaptoethanol oder 1-Thioglycerin)

Das Reagenz ist bis zu 5 Tage haltbar, wenn es bei 2–8 °C gelagert wird. Während des gesamten Verfahrens sollte dasselbe Reagenz verwendet werden.

1. Wiegen Sie 120 mg OPA in ein Glasgefäß ab.
2. Geben Sie 3 ml 100%iges Methanol, 15 ml Boratpuffer und entweder 150 µl Mercaptoethanol oder 179 µl 1-Thioglycerin hinzu.
3. Über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen lassen.

• Programmierung des Autosamplers

Hinweis: Es ist wichtig, dass die Standards und die Probeneluat innerhalb von 3 Minuten auf die HPLC injiziert werden, wenn sie OPA-Reagenz mit Mercaptoethanol enthalten, bzw. innerhalb von 10 Minuten, wenn sie OPA-Reagenz mit 1-Thioglycerin enthalten. Es wird auch empfohlen, die Zeitspanne nach der Zugabe des OPA und der Injektion in die HPLC sowohl für die Proben als auch für die Standards konstant zu halten, um die Variabilität zu minimieren.

Das Programm ist so eingestellt, dass ein leeres Gefäß in eine Position des Autosamplers gestellt wird, die vor der Position der Probenlösung liegt, z. B. für die erste Injektion eines Laufs wird das Mischgefäß in Position 1 gestellt, während sich die in das Mischgefäß zu injizierende Probenlösung in Position 2 des Autosamplers befindet.

1. 200 µl OPA-Reagenz werden in das Mischgefäß injiziert.
2. 200 µl Eluat werden in das Mischgefäß injiziert.
3. 200 µl Mischung werden aufgezogen und dreimal dispensiert.
4. 100 µl der derivatisierten Probe werden in das System injiziert.

Probenvorbereitung

• Getreide

Diese Methode wurde an Getreide getestet, darunter Weizen, Gerste, Mais, sowie an Produkten auf Getreidebasis, u. a. Maisstärke, Popcorn und Cornflakes.

1. Wiegen Sie 25 g Probe und 5 g Natriumchlorid in ein lösungsmittelbeständiges Mischglas mit einem Fassungsvermögen von 1 Liter ab.
2. Geben Sie 125 ml Acetonitril : Methanol : Wasser (25 : 25 : 50 v/v) hinzu und mischen Sie mit hoher Geschwindigkeit 2 Minuten lang.
3. Filtrieren Sie den Extrakt durch Filterpapier (Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder zentrifugieren Sie 10 Minuten bei 4.000 RPM.
4. Verdünnen Sie 10 ml des Filtrats mit 40 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).
5. Filtrieren Sie den verdünnten Extrakt durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier.
6. Lassen Sie 10 ml des verdünnten Filtrats (entspricht 0,4 g Probe) mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen (die Probe kann auch mittels Schwerkraft durch die Säule laufen, falls bevorzugt). Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Bindung der Toxine durch den Antikörper unerlässlich.
7. **HPLC:** Waschen Sie die Säule mit 10 ml PBS.
LC-MS/MS: Waschen Sie die Säule mit 20 ml Wasser.
Die Säule sollte mit einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute gewaschen werden. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
8. Eluieren Sie die Toxine aus der Säule bei einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1,5 ml 100%igem Methanol und sammeln Sie sie in einem Braunglasgefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
9. Lassen Sie nach der Elution 1,5 ml Wasser durch die Säule laufen und sammeln Sie es im selben Gefäß, sodass sich ein Gesamtvolumen von 3 ml ergibt.

HPLC:

10. Geben Sie 200 µl Eluat zu 200 µl OPA-Reagenz. Programmieren Sie den Autosampler zur Durchführung der Derivatisierung der Probe. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Programmierung des Autosamplers“.
11. Injizieren Sie 100 µl in das HPLC-System.

LC-MS/MS:

10. Injizieren Sie 50 µl in das LC-MS/MS System.

Zubereitung von Standards

• Fumonisin-Stammlösung

Es empfiehlt sich, mit 100.000 ng/ml Fumonisin (FB1 und FB2) Stammlösungen zu beginnen.

Hinweis: Das Verhältnis von FB1 und FB2 kann bei jedem Standard variieren. Bitte beachten Sie das korrekte Verhältnis für den gekauften Standard.

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 zubereitet und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.

Beispiel für die Erstellung einer Kalibrierkurve (kann gemäß gesetzlichen Anforderungen oder Kontaminationsgraden geändert werden):

1. Messen Sie 7,5 ml 50%iges Methanol in ein Braunglasgefäß ab.
2. Schütten Sie 300 µl weg.
3. Geben Sie 300 µl der 100.000 ng/ml Gesamtfumonisin-Standards hinzu, um 4.000 ng/ml Arbeitslösung zu erhalten.

HPLC:

4. Standard 3: Nehmen Sie 500 µl der 4.000 ng/ml Gesamtfumonisinlösung und fügen Sie 1,5 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 1.000 ng/ml).
5. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml Standard 3 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 500 ng/ml).
6. Standard 1: Nehmen Sie 1 ml Standard 2 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 250 ng/ml).
7. Geben Sie 200 µl eines jeden Standards zu 200 µl OPA-Reagenz. Programmieren Sie den Autosampler zur Durchführung der Derivatisierung einer jeden Lösung. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Programmierung des Autosamplers“.
8. Injizieren Sie 100 µl jeder Lösung in das HPLC-System.

LC-MS/MS:

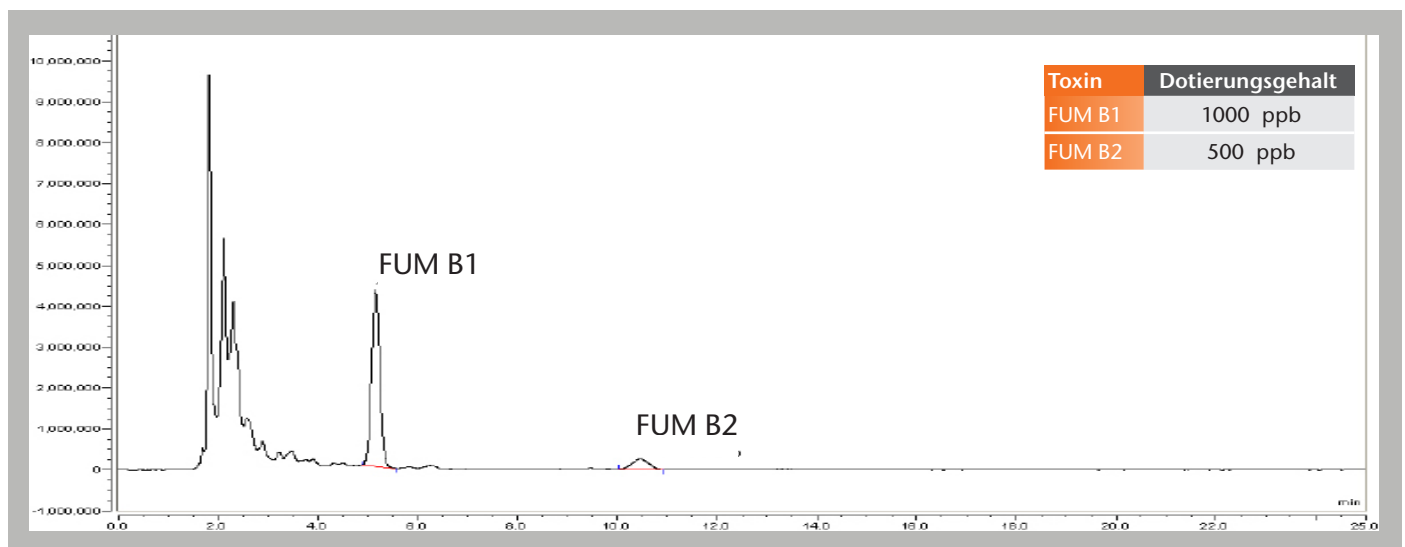
4. Standard 5: Nehmen Sie 500 µl der 4.000 ng/ml Gesamtfumonisinlösung und fügen Sie 1,5 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 1.000 ng/ml).
5. Standard 4: Nehmen Sie 1 ml Standard 5 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 500 ng/ml).
6. Standard 3: Nehmen Sie 1 ml Standard 4 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 250 ng/ml).
7. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml Standard 3 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 125 ng/ml).
8. Standard 1: Nehmen Sie 1 ml Standard 2 und fügen Sie 1 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 62,5 ng/ml).
9. Injizieren Sie 50 µl jeder Lösung in das LC-MS/MS-System.

Empfohlene Bedingungen für HPLC

HPLC-Bedingungen	
Derivatisierung	OPA-Reagenz
Vorläufersäulenkartusche	C18 deaktivierte Umkehrphasen-Kartusche oder gleichwertig 10 mm x 4,6 mm I.D.
Analysesäule	Inertsil ODS-3V 5 µm, 4,6 mm x 150 mm (Hichrom) oder gleichwertig
Mobile Phase	Methanol: 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat (77 : 23 v/v) Geben Sie 11,998 g Natriumphosphat zu 1 l Wasser, um eine 0,1-M-Lösung zu erhalten. Stellen Sie den pH-Wert mit O-Phosphorsäure auf 3,3 ein. Am Tag der Analyse frisch zubereiten.
HPLC-Pumpe	Zur Lieferung der mobilen Phase
Flussrate	1,0 ml pro Minute
Fluoreszenzdetektor	Anregung: 335 nm Emission: 440 nm
Säulenofen	Vorläufer und Analysensäule bei 40 °C halten
Integrator/ Datenkontrollsystem	Vom bevorzugten Lieferanten
Injektor	Autosampller/Rheodyn-Ventil
Injektionsvolumen	100 µl

Beispiel für HPLC-Chromatogramm

- Mais



Empfohlene Bedingungen für LC-MS/MS

LC-Bedingungen			
Analysesäule	Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 A, 150 mm x 3 mm oder gleichwertig		
Mobile Phase	Mobile Phase A: 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in 5%igem Methanol Mobile Phase B: 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in 98%igem 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	+1.500 Volt
Quellentemperatur	150 °C
Desolvatationsgastemperatur	350 °C
Desolvatationsgasfluss	600 L/h (N)
Flussrate des Conegases	50 L/h (N)

Geräteeinstellung						
Toxin	Zeits- egment (min)	Vorläufer-Ion (m/z)	Produktionen (m/z)	Verweilzeit (s)	Konusspan- nung (V)	Kollisions- spannung (eV)
Fumonisin B1	6,5–9,5	722,39 [M+H] ⁺	334,39 (Quantifizierer)	0,105	52	40
			352,40 (Qualifizierer)		52	38
Fumonisin B2	8,5–10,5	706,39 [M+H] ⁺	336,40 (Quantifizierer)	0,105	56	40
			318,39 (Qualifizierer)		56	42

Beispiel für LC-MS/MS Chromatogramm

- Mais



Qualität

Die Produkte von RBR werden unter einem nach ISO 9001 zertifizierten Qualitätsmanagementsystem entwickelt, gefertigt, getestet und geliefert. Dies garantiert ein konsistentes Produkt, das stets Ihren Leistungsanforderungen entspricht. Unsere Produkte wurden in mehreren Ringversuchen zur Entwicklung europäischer und internationaler Standardmethoden verwendet und finden in wichtigen Einrichtungen, Lebensmittelunternehmen und staatlichen Labors Anwendung. Kundenreferenzen für Produkte von RBR 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 Serviceleistungen:

- 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 übernimmt keinerlei Gewähr, 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 besonderer 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