

DONPREP[®]

Produktcode: P50 / P50B

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

P50/V18/27.05.22

www.r-biopharm.com



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Inhalt

	Seite
Testprinzip	4
Nicht enthaltene Reagenzien	4
Zubehörprodukte	4
Gefahren	4
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise	4
Dekontamination	5
Lagerung und Haltbarkeit	5
Probennahme	5
Sensitivität	5
Wiederfindungen	5
Säulenvorbereitung	5
Elution	6
Probenvorbereitung	7
• Getreide	7
• Futtermittel	8
Zubereitung von Standards	9
Kalibrierkurve	9
• Für HPLC	9
• Für LC-MS/MS	9
Empfohlene Bedingungen für HPLC	10
Beispiel für HPLC Chromatogramme	11
• Getreide (Dotierungsgehalt 1250 ppb)	11
• Futtermittel (Dotierungsgehalt 5000 ppb)	11
Empfohlene Bedingungen für LC-MS/MS	12
Beispiel für LC-MS/MS Chromatogramme	13
• Getreide (Dotierungsgehalt 20 ppb)	13
• Futtermittel (Dotierungsgehalt 5000 ppb)	13
Qualität	14
Technischer Support	14
Garantie	14

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 des Toxins wird der Probenextrakt filtriert, verdünnt und langsam durch die Immunoaffinitätssäule geleitet. In der Probe vorhandenes Toxin wird 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 von der Säule gelöst. Das Eluat wird vor der Analyse mittels HPLC oder LC-MS/MS gesammelt, eingedampft und rekonstituiert.

Die gesamte Extraktions- und Aufreinigungszeit beträgt etwa 20 Minuten. Das Ergebnis ist eine verbesserte Reinheit und Konzentration des Toxins aus Lebens- und Futtermittelproben, was ein weitaus reineres Chromatogramm liefert und daher für eine genauere und empfindlichere 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 und Acetonitril in HPLC-Qualität)
- Deoxynivalenol-Standard (siehe Abschnitt „Vorbereitung von Standards“)
- Natriumhydroxid (zur pH-Wert-Einstellung des Filtrats, falls erforderlich)
- Natriumchlorid

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.

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 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

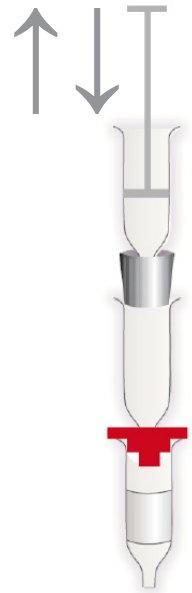
Um das/die Toxine/e vollständig aus der Immunaффinitätssäule zu eluieren, muss das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper in der Gelsuspension in Kontakt sein. Dadurch wird sichergestellt, dass alle Bindungen zwischen dem Antikörper und dem Toxin aufgebrochen werden und so das gesamte Toxin aus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



Probenvorbereitung

• Getreide

Diese Methode wurde an Getreide getestet, darunter Weizen, Gerste, Mais, sowie an Produkten auf Getreidebasis.

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 200 ml Wasser hinzu und mischen Sie mit hoher Geschwindigkeit 2 Minuten lang.
3. Filtrieren Sie die Probe durch Filterpapier (Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) oder zentrifugieren Sie für 10 Minuten bei 4.000 RPM.
4. Noch einmal durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier filtern.
5. Lassen Sie 2 ml des Filtrats (entspricht 0,25 g der 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 des Toxins durch den Antikörper unerlässlich.
6. Waschen Sie die Säule, indem Sie 10 ml Wasser mit einer Flussrate von ca. 5 ml pro Minute durchlaufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
7. Eluieren Sie das Toxin aus der Säule bei einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1,5 ml 100%igem Methanol und sammeln Sie es in einem geeigneten Gefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.

HPLC:

8. Lassen Sie das Eluat an der Luft bei 60–70 °C bis zur Trockene eindampfen.
9. Mit 1 ml 15%igem Methanol rekonstituieren. 20 Sekunden lang vortexen.
10. Injizieren Sie 100 µl des rekonstituierten Eluats in das HPLC-System.

LC-MS/MS:

8. 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.
9. Injizieren Sie 10 µl Eluat in das LC-MS/MS-System.

Probenvorbereitung

• Futtermittel

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 200 ml Wasser hinzu und mischen Sie mit hoher Geschwindigkeit 2 Minuten lang.
3. Zentrifugieren Sie die Probe bei 4.000 U/min für 10 Minuten.
4. Stellen Sie den pH-Wert mit 2 M Natriumhydroxid auf etwa 7,4 ein.
5. Filtern Sie den Überstand durch ein Glasmikrofaser-Filterpapier.
6. Wenn Sie bei einer Konzentration von 6.000 ppb oder weniger analysieren, lassen Sie 2 ml des Filtrats (entspricht 0,25 g der 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 des Toxins durch den Antikörper unerlässlich.

oder

Wenn Sie bei einer Konzentration von mehr als 6.000 ppb analysieren, verdünnen Sie 2 ml des Filtrats mit 2 ml Wasser.

Lassen Sie 2 ml des verdünnten Filtrats (entspricht 0,125 g der 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 des Toxins durch den Antikörper unerlässlich.

7. Waschen Sie die Säule, indem Sie 10 ml Wasser mit einer Flussrate von ca. 5 ml pro Minute durchlaufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
8. Eluieren Sie das Toxin aus der Säule bei einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1,5 ml 100%igem Methanol und sammeln Sie es in einem geeigneten Gefäß. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.

HPLC:

9. Lassen Sie das Eluat an der Luft bei 60–70 °C bis zur Trockene eindampfen.
10. Mit 1 ml 15%igem Methanol rekonstituieren. 20 Sekunden lang vortexen.
11. Injizieren Sie 100 µl des rekonstituierten Eluats in das HPLC-System.

LC-MS/MS:

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

Zubereitung von Standards

Es empfiehlt sich, mit 100.000 ng/ml Deoxynivalenol-Stammlösung zu beginnen.

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 Erstellung einer Sechs-Punkt-Kalibrierkurve (kann gemäß gesetzlichen Anforderungen oder Kontaminationsgraden geändert werden):

HPLC:

1. Geben Sie 200 µl des rekonstituierten kristallinen Standards zu 800 µl 100%igem Acetonitril (entspricht 20.000 ng/ml).
2. Lassen Sie 200 µl der Lösung an der Luft bei 60–70 °C bis zur Trockene eindampfen.
3. Standard 6: Rekonstituieren Sie mit 2 ml 15%igem Methanol (entspricht 2.000 ng/ml).
4. Standard 5: Nehmen Sie 1 ml Standard 6 und fügen Sie 1 ml 15%iges Methanol hinzu (entspricht 1.000 ng/ml).
5. Standard 4: Nehmen Sie 1 ml Standard 5 und fügen Sie 1 ml 15%iges Methanol hinzu (entspricht 500 ng/ml).
6. Standard 3: Nehmen Sie 1 ml Standard 4 und fügen Sie 1 ml 15%iges Methanol hinzu (entspricht 250 ng/ml).
7. Standard 2: Nehmen Sie 1 ml Standard 3 und fügen Sie 1 ml 15%iges Methanol hinzu (entspricht 125 ng/ml).
8. Standard 1: Nehmen Sie 1 ml Standard 2 und fügen Sie 1 ml 15%iges Methanol hinzu (entspricht 62,5 ng/ml).
9. Injizieren Sie 100 µl jeder Lösung in das HPLC-System.

LC-MS/MS:

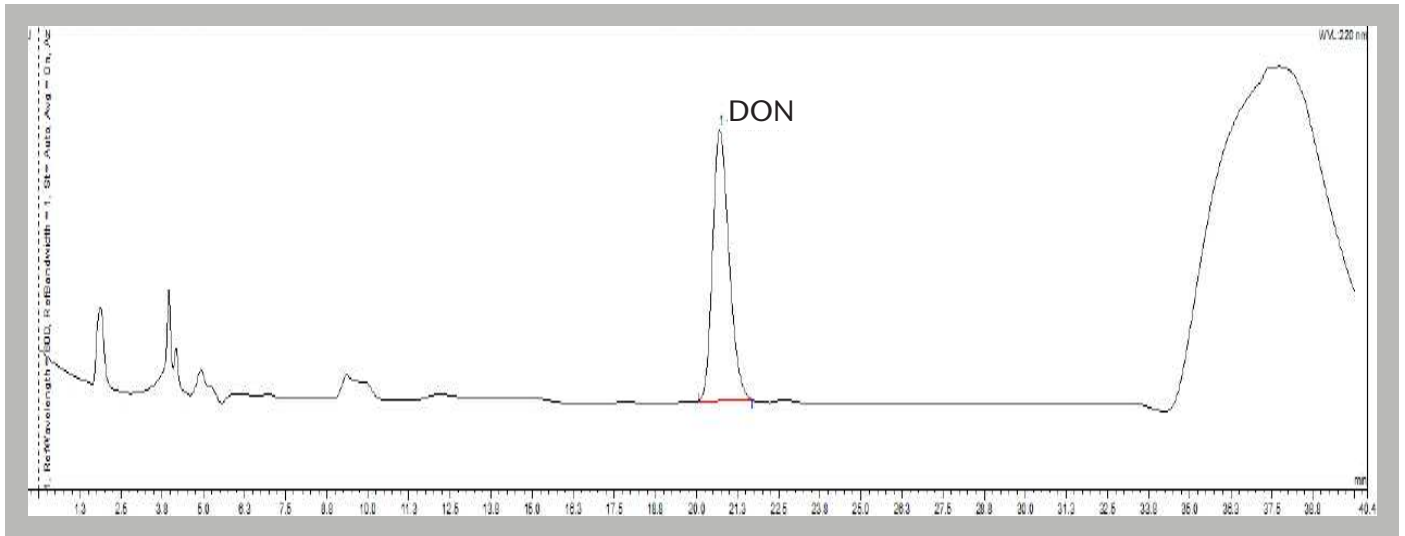
1. Standard 6: Nehmen Sie 10 ml 50%iges Methanol und entfernen Sie 66,7 µl. Geben Sie 66,7 µl von 100.000 ng/ml Deoxynivalenol-Standard hinzu, um eine Konzentration von 666,7 ng/ml zu erhalten.
2. Standard 5: Nehmen Sie 2 ml Standard 6 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 333,3 ng/ml)
3. Standard 4: Nehmen Sie 2 ml Standard 5 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 166,7 ng/ml)
4. Standard 3: Nehmen Sie 2 ml Standard 4 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 83,3 ng/ml)
5. Standard 2: Nehmen Sie 2 ml Standard 3 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 41,7 ng/ml)
6. Standard 1: Nehmen Sie 2 ml Standard 2 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 20,8 ng/ml)
7. Injizieren Sie 10 µl jeder Lösung in das LC-MS/MS-System.

Empfohlene Bedingungen für HPLC

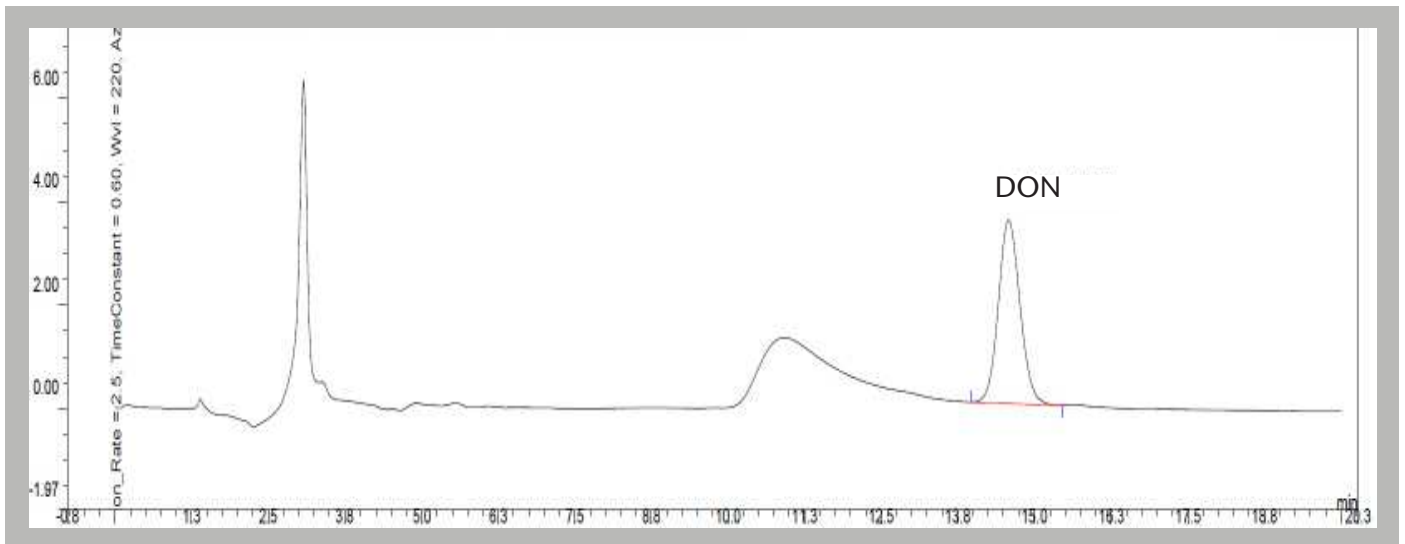
HPLC-Bedingungen			
Vorläufersäulenkartusche	AQUASIL C18 3 µm, 4 mm x 10 mm oder gleichwertig		
Analysesäule	AQUASIL C18 3 µm, 4,6 mm x 150 mm oder gleichwertig		
Mobile Phase	Mobile Phase A: Wasser Mobile Phase B: Methanol Am Tag der Analyse frisch zubereiten		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	85	15
	25	85	15
	26	50	50
	30	50	50
	31	85	15
	40	85	15
HPLC-Pumpe	Zur Lieferung der mobilen Phase		
Flussrate	0,4 ml pro Minute		
UV-Detektor	220 nm		
Säulenofen	Vorläufer und Analysensäule bei 30 °C halten		
Integrator/ Datenkontrollsystem	Vom bevorzugten Lieferanten		
Injektor	Autosampler/Rheodyn-Ventil		
Injektionsvolumen	100 µl		

Beispiel für HPLC Chromatogramme

- Getreide (Dotierungsgehalt 1250 ppb)



- Futtermittel (Dotierungsgehalt 5000 ppb)



Empfohlene für Bedingungen LC-MS/MS

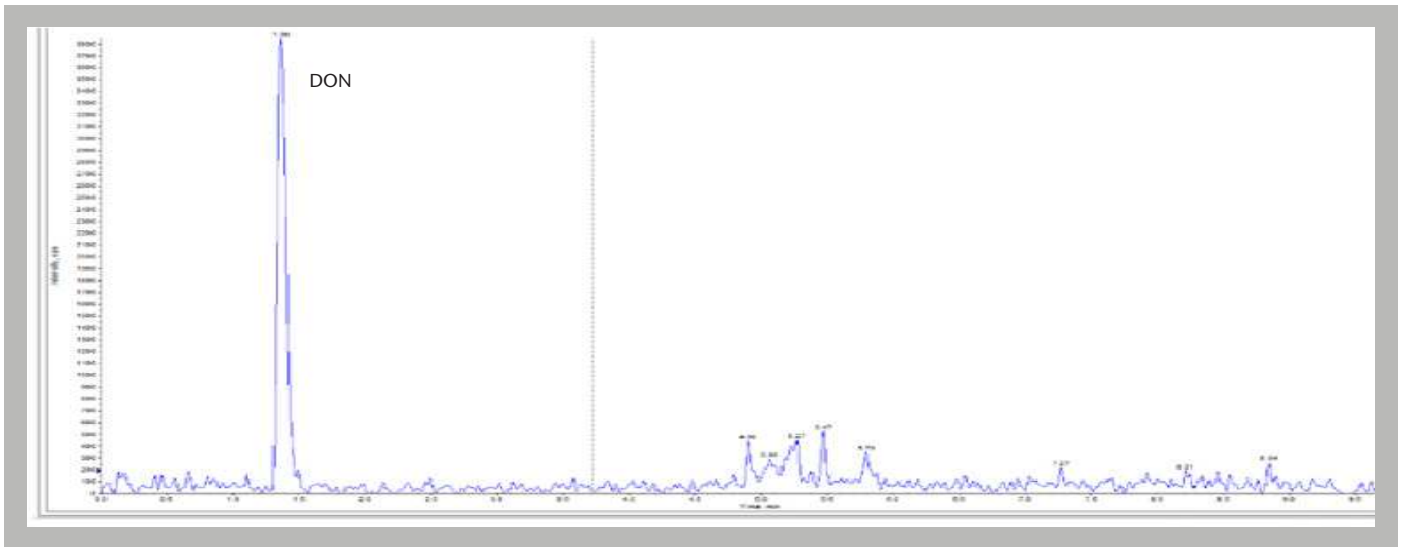
LC-MS/MS-Bedingungen			
Analysesäule	Luna Omega Polar C18, 110 Å, 100 x 3 mm, 3 µm oder gleichwertig		
Mobile Phase	Mobile Phase A: 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser : Methanol 95: 5 (v/v) Mobile Phase B: 1 mM Ammoniumformat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser : Methanol 2: 98 (v/v). Am Tag der Analyse frisch zubereiten		
Gradienten- Bedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	60	40
	0,5	60	40
	4,0	0	100
	6,0	0	100
	6,1	60	40
	10	60	40
HPLC-Pumpe	Zur Lieferung der mobilen Phase		
Flussrate	0,6 ml pro Minute		
Säulenofen	Vorläufer und Analysensäule bei 40 °C halten		
Integrator/Daten- kontrollsystem	Vom bevorzugten Lieferanten		
Injektionsvolumen	10 µl		

Massenspektrometriebedingungen	
Gerät	SCIEX QTRAP 5500
Modus	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Quellentemperatur	450 °C
Ionen-Spray	3500 V
Ionenquelle Gas 1	50 psi
Ionenquelle Gas 2	55 psi
Curtain Gas	50 psi

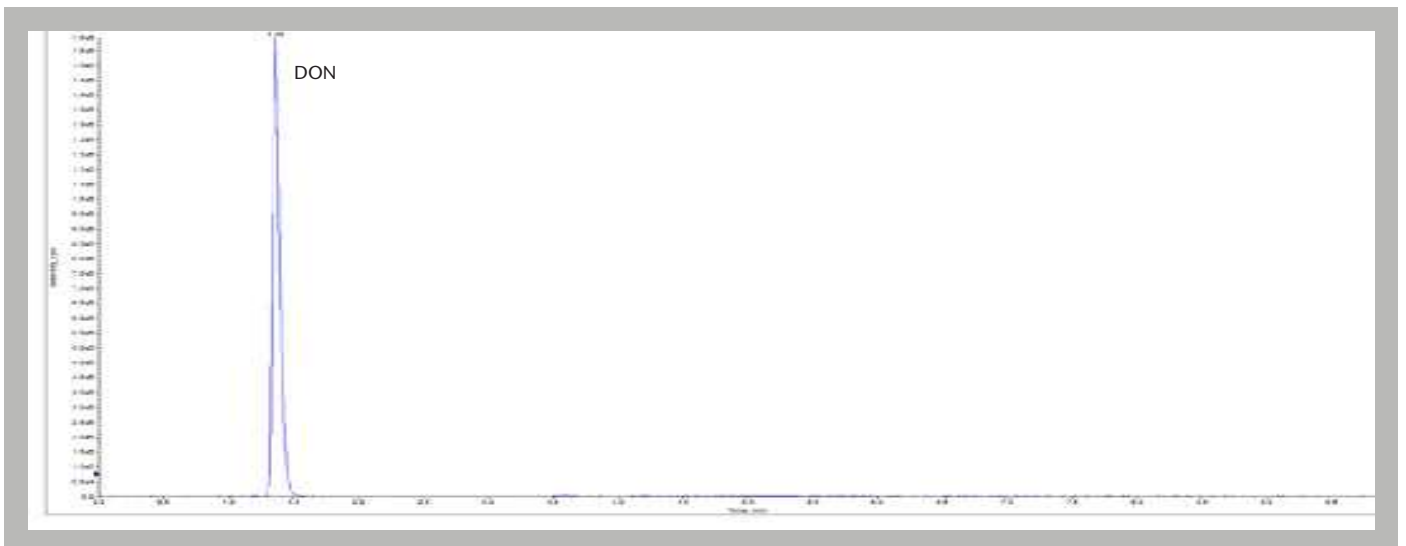
GeräteEinstellung						
Toxin	Zeitsegment (min)	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ionen (m/z)	Verweilzeit (s)	Kollisionsenergie (V)	Zellausgangspotential (V)
DON	1,36	297,1 [M+H] ⁺	249,00 (Quantifizierer) 231,00 (Qualifizierer)	20	15,00 17,00	16,00 15,00

Beispiel für LC-MS/MS Chromatogramme

- Getreide (Dotierungsgehalt 20 ppb)



- Futtermittel (Dotierungsgehalt 5000 ppb)



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.

