

# AFLAPREP<sup>®</sup> M WIDE

Código del producto: P124 / P124B

Columnas de inmunoafinidad para su uso en combinación con HPLC o LC-MS/MS.

Exclusivamente para uso *in vitro*.

P124/V7/30.06.21





Principio del ensayo.....	4
Reactivos no suministrados.....	4
Productos accesorios .....	4
Riesgos .....	4
Descontaminación .....	5
Almacenamiento y vida útil.....	5
Muestreo .....	5
Sensibilidad .....	5
Recuperaciones.....	5
Preparación de la columna .....	5
Elución .....	6
Preparación de las muestras.....	7
• Leche .....	7
• Leche en polvo .....	8
Preparación de los estándares.....	9
Curva de calibración .....	9
Condiciones recomendadas para la HPLC .....	10
Ejemplo de cromatograma de HPLC de leche en polvo (enriquecida a 0,05 ppb) .....	11
Calidad .....	12
Soporte técnico .....	12
Garantía.....	12

## Principio del ensayo

El procedimiento se basa en la tecnología de anticuerpos monoclonales, lo que hace que la prueba sea altamente específica, sensible, rápida y sencilla de realizar.

Las columnas contienen una suspensión de gel de anticuerpo monoclonal específico para la toxina en cuestión. La muestra se filtra y se hace pasar lentamente por la columna de inmunoafinidad. Cualquier toxina presente en la muestra es retenida por el anticuerpo dentro de la suspensión de gel. La columna se lava para eliminar el material no unido y la toxina se libera de la columna tras la elución con disolvente. El eluido se recolecta antes del análisis por HPLC o LC-MS/MS.

El tiempo total de extracción y limpieza es de aproximadamente 30 minutos. El resultado es una mejor limpieza y concentración de la toxina a partir de muestras de alimentos y piensos, para generar un cromatograma mucho más limpio y, por lo tanto, una detección más precisa y sensible. Las columnas también tienen la ventaja adicional de que pueden automatizarse para el análisis de muestras a gran escala.

## Reactivos no suministrados

- Agua destilada/desionizada (apta para su uso con HPLC, por ejemplo, MilliQ)
- Disolventes (metanol y acetonitrilo de grado HPLC)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (RP202)\*
- Estándar de aflatoxina M1 (consultar la sección de preparación de estándares)

## Productos accesorios

- Papel de filtro Whatman n.º 113 o n.º 4
- Soporte de columna de inmunoafinidad (CR1)\*
- Paquete de accesorios para la columna de inmunoafinidad (AP01)\*

\* Disponible en R-Biopharm. Comuníquese con su distribuidor local de R-Biopharm para obtener mayor información.

## Riesgos

Las micotoxinas son sustancias muy peligrosas. Solo los laboratorios equipados para manejar materiales tóxicos y disolventes deben realizar los análisis. Debe usarse ropa de protección adecuada, como guantes, gafas de seguridad y batas de laboratorio durante todo el análisis.

Los disolventes inflamables deben almacenarse en un armario a prueba de explosiones. Utilizar una campana extractora de productos químicos y equipos de protección, según corresponda.

Póngase en contacto con su distribuidor local de R-Biopharm para obtener una hoja de datos de seguridad del material para obtener más información si es necesario.

## Métodos recomendados y notas de aplicación

Hay métodos disponibles para todas las matrices cubiertas por la legislación, así como para otros productos básicos. El incumplimiento de los métodos descritos en nuestras instrucciones de uso y notas de aplicación pueden impedir el logro de resultados óptimos. Comuníquese con su distribuidor local de R-Biopharm para obtener mayor información.

## **Descontaminación**

Antes de su eliminación, las soluciones estándar sobrantes deben tratarse con al menos una décima parte de su volumen de hipoclorito de sodio al 5 %. El material de laboratorio y los residuos contaminados deben sumergirse en solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 30 minutos, seguido de la adición de acetona al 5 % durante 30 minutos. Llenar al ras con abundante cantidad de agua antes de su eliminación. Tras la descontaminación, el material de laboratorio debe lavarse bien. Incinerar los residuos si la normativa lo permite.

## **Almacenamiento y vida útil**

Las columnas caducan a los 18 meses de la fecha de fabricación si se almacenan a 2 - 8 °C o a los 12 meses de la fecha de fabricación si se almacenan a 21 - 25 °C. No congelar.

Asegurarse de que la columna no se ha secado y contiene tampón por encima del gel. Es importante tener en cuenta que el anticuerpo incluido en la columna de inmunoafinidad puede desnaturalizarse por un cambio extremo de temperatura o de pH.

## **Muestreo**

Se debe obtener una muestra representativa siguiendo uno de los procedimientos de muestro oficialmente reconocidos. Se recomienda moler finamente un mínimo de 1 kg de muestra representativa y una porción (de 5 a 50 g, según el método utilizado) de esto se retira y extrae.

## **Sensibilidad**

La sensibilidad depende del sistema de detección final empleado por el analista. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba puede mejorarse si es necesario aumentando el volumen de la muestra que pasa por la columna de inmunoafinidad. Tenga en cuenta que la relación entre el disolvente y la solución salina tamponada con fosfato (PBS) debe mantenerse.

## **Recuperaciones**

Si un analista desea tener en cuenta las pérdidas durante la extracción, se recomienda analizar una muestra enriquecida del mismo tipo de producto básico que el material que se está evaluando, siguiendo el procedimiento completo como estándar de referencia. Las recuperaciones obtenidas con la muestra enriquecida pueden utilizarse para corregir los resultados obtenidos con la muestra de ensayo.

## **Preparación de la columna**

Las columnas de inmunoafinidad deben estar a temperatura ambiente antes de su uso. Retirar la tapa de la parte superior de la columna y desechar. Fijar firmemente la columna a una jeringa de vidrio mediante un adaptador y colocarla en un soporte de columna de inmunoafinidad o un soporte de pinza.

## Elución

Para eluir completamente la/s toxina/s de la columna de inmunoafinidad es vital que el disolvente esté en contacto con el anticuerpo dentro de la suspensión de gel durante un período de tiempo suficiente. Esto asegura que todos los enlaces entre el anticuerpo y la toxina se rompan, liberando finalmente toda la toxina de la columna para su análisis con el sistema de detección elegido.

Para garantizar que el disolvente esté en contacto con el gel de anticuerpos durante un período de tiempo suficiente, se puede utilizar cualquiera de los siguientes métodos de elución: -

**Lavado a contracorriente (este es el método preferido en R-Biopharm):** el retrolavado se realiza subiendo y bajando suavemente el émbolo de la jeringa durante el paso del disolvente por la columna. Este proceso invertirá la dirección del flujo del eluido a través del gel. Esto debe repetirse 3 veces antes de recoger el eluido. Pasar al siguiente paso del método.

**Aplicación de pequeños volúmenes de disolvente:** aplicar el volumen de disolvente necesario para la elución en dos o tres alícuotas más pequeñas. Dejar que cada alícuota permanezca en contacto con la suspensión de gel durante un mínimo de 30 segundos antes de permitir que cada una pase totalmente a través de la suspensión de gel para su recolección. Continuar con el siguiente paso del método.

**Incubación con disolvente:** aplicar todo el volumen de disolvente necesario para la elución y dejar pasar 2-3 gotas del disolvente por la columna para su recolección. Dejar que el resto del disolvente permanezca en contacto con la suspensión de gel durante un mínimo de 60 segundos antes de permitir que pase a través de la suspensión de gel para su recolección. Continuar con el siguiente paso del método.



## Preparación de las muestras

### • Leche

Este método se ha probado en varios productos lácteos, como la leche de vaca, la leche de cabra, la leche de soya y la nata.

1. Medir 100 mL de la muestra en un vaso de precipitados de vidrio y calentar a unos 35 - 37 °C.
2. Filtrar la muestra a través del papel de filtro Whatman n.º 113 o n.º 4, o centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
3. Pasar 50 mL de filtrado a través de la columna a un caudal de 2 mL por minuto (o, si se prefiere, se puede dejar que la muestra pase por la columna por gravedad). Un flujo lento y constante es esencial para que el anticuerpo capture la toxina.
4. Lavar la columna haciendo pasar 20 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un flujo de aproximadamente 5 mL por minuto. Hacer pasar aire por la columna para eliminar el líquido residual.
5. Eluir la toxina de la columna a una caudal de 1 gota por segundo utilizando 1,25 mL de metanol : acetonitrilo (40: 60 v/v) y recoger en un vial de vidrio ámbar. Consultar la sección de elución para obtener más información.
6. Tras la elución, pasar 1,25 mL de agua a través de la columna y recogerla en el mismo vial para obtener un volumen total de 2,5 mL.
7. Inyectar 100 µL en el sistema de HPLC.

## Preparación de las muestras

### • Leche en polvo

1. Medir 100 mL de agua en un vaso de precipitados de vidrio y calentarla a unos 35 - 37 °C. Tomar 80 mL del agua calentada y añadir a 20 g de muestra. Mezclar bien.
2. Completar hasta 100 mL con el resto del agua calentada.
3. Filtrar la muestra a través del papel de filtro Whatman n.º 113 o n.º 4, o centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
4. Pasar 50 mL del filtrado (equivalente a 10 g de muestra) a través de la columna a un caudal de 2 mL por minuto (o, si se prefiere, se puede dejar que la muestra pase por la columna por gravedad). Un caudal lento y constante es esencial para que el anticuerpo capture la toxina.
5. Lavar la columna haciendo pasar 20 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un flujo de aproximadamente 5 mL por minuto. Hacer pasar aire por la columna para eliminar el líquido residual.
6. Eluir la toxina de la columna a una caudal de 1 gota por segundo utilizando 1,25 mL de metanol : acetonitrilo (40: 60 v/v) y recoger en un vial de vidrio ámbar. Consultar la sección de elución para obtener más información.
7. Tras la elución, pasar 1,25 mL de agua a través de la columna y recogerla en el mismo vial para obtener un volumen total de 2,5 mL.
8. Inyectar 100 µL en el sistema de HPLC.



## Preparación de los estándares

Preparación de soluciones madre de aflatoxina M1 de 1000 ng/mL:

1. Se puede adquirir un polvo cristalino de aflatoxina M1. Póngase en contacto con su distribuidor local de R-Biopharm para obtener más información. El polvo se reconstituye según las instrucciones proporcionadas y se deja durante la noche en la oscuridad a temperatura ambiente para obtener un concentrado de solución madre.
2. A continuación, se utiliza para preparar una solución estándar de aflatoxina M1 de 1000 ng/mL.

## Curva de calibración

Se recomienda realizar al menos una curva de calibración de 3 a 6 puntos. Al construir una curva adecuada, las concentraciones de los estándares de calibración deben abarcar o incluir el intervalo de resultados esperados. Las soluciones estándar diluidas deben prepararse el día del análisis y utilizarse en un plazo de 24 horas.

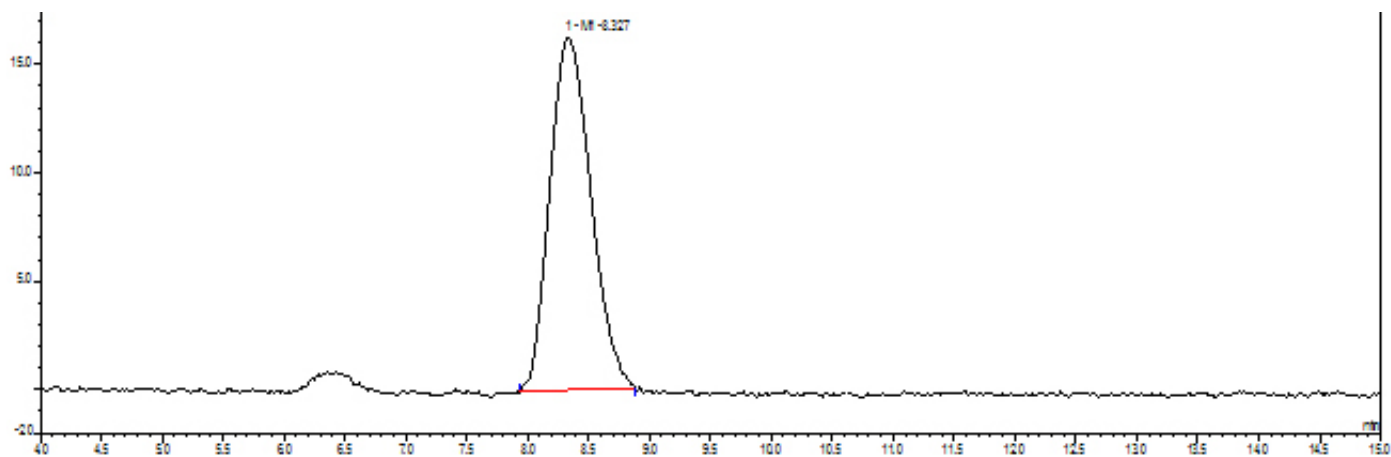
Ejemplo de cómo preparar una curva de calibración de tres puntos (puede modificarse según la legislación o niveles de contaminación):

1. Medir 1 mL de metanol : acetonitrilo : agua (20: 30: 50 v/v/v) en un frasco ámbar.
2. Retirar 100 µL y desechar.
3. Añadir 100 µL de estándar de aflatoxina M1 1000 ng/mL para obtener una solución de aflatoxina M1 de 100 ng/mL.
4. Estándar 3: Tomar 50 µL de solución de aflatoxina M1 100 ng/mL y completar hasta 2,5 mL con metanol : acetonitrilo : agua (20: 30: 50 v/v/v) (equivalente a 2 ng/mL).
5. Estándar 2: Tomar 1 mL de la solución 2 ng/mL y añadir 1 mL de metanol : acetonitrilo : agua (20: 30: 50 v/v/v) (equivalente a 1 ng/mL).
6. Estándar 1: Tomar 1 mL de la solución 1 ng/mL y añadir 1 mL de metanol : acetonitrilo : agua (20: 30: 50 v/v/v) (equivalente a 0,5 ng/mL).
7. Inyectar 100 µL de cada solución en el sistema HPLC.

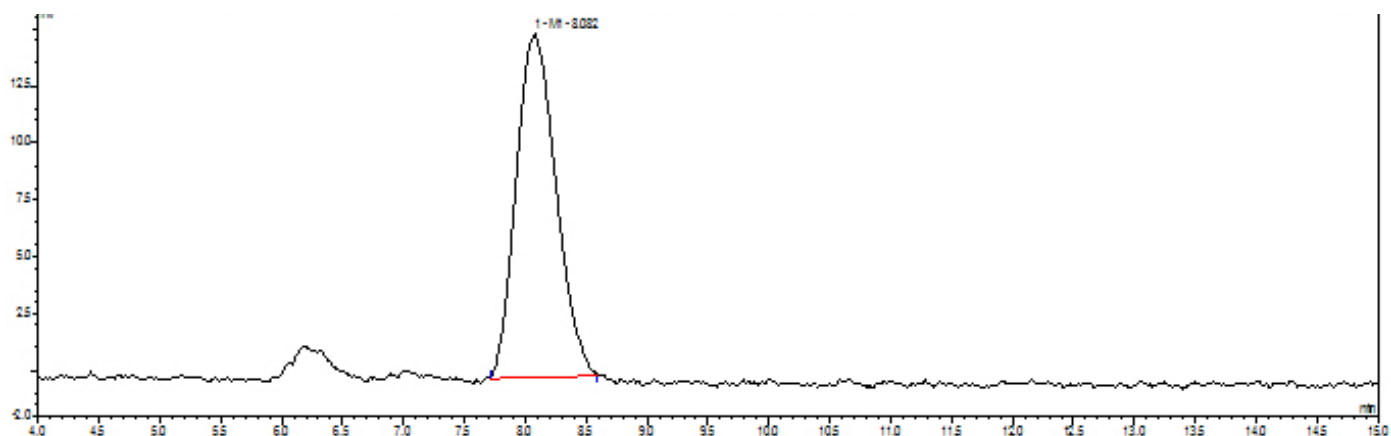
## Condiciones recomendadas para la HPLC

Condiciones de HPLC	
Cartucho de protección	Inertsil ODS-3 5 $\mu$ m, 4 mm x 10 mm (Hichrom) o equivalente
Columna analítica	Inertsil ODS-3V 5 $\mu$ m, 4,6 mm x 150 mm (Hichrom) o equivalente
Fase móvil	Agua : Acetonitrilo : Metanol (68: 24: 8 v/v/v) Preparar el día del análisis.
Bomba de HPLC	Para suministrar la fase móvil
Caudal	1,0 mL por minuto
Detector de fluorescencia	Excitación: 360 nm Emisión: 430 nm
Calentador de columna	Mantener las columnas de protección y de análisis a 25 °C
Integrador / Sistema de control de datos	Del proveedor preferido
Inyector	Muestreador automático / Válvula Rheodyne
Volumen de inyección	100 $\mu$ L

### Ejemplo de cromatograma de HPLC de leche (enriquecida a 0,05 ppb)



### Ejemplo de cromatograma de HPLC de leche en polvo (enriquecida a 0,05 ppb)



## Calidad

Los productos de RBR se desarrollan, fabrican, evalúan y envían bajo un sistema de gestión de calidad registrado con la norma ISO 9001, lo que garantiza un producto uniforme, que siempre cumple con nuestras especificaciones de rendimiento. Nuestros productos se han utilizado en muchos estudios de colaboración para desarrollar métodos estándar europeos e internacionales y son ampliamente utilizados por instituciones clave, empresas alimentarias y laboratorios gubernamentales. La recomendación de productos RBR para los clientes está disponible a petición.

## Soporte técnico

RBR entiende que los usuarios de nuestros productos pueden necesitar asistencia o asesoramiento ocasionalmente. Por ello, nos complace ofrecer los siguientes servicios a nuestros clientes:

- Análisis de muestras problema.
- Notas de aplicación para muestras difíciles.
- Referencias de la biblioteca RBR.
- Instalación y soporte del KOBRA® CELL.
- Asesoría sobre los parámetros de detección.
- Asesoría sobre la preparación y el manejo de los estándares.
- Actualizaciones sobre legislación, muestreo y otras noticias por correo electrónico.
- Suministro de muestras enriquecidas.

Comuníquese con su distribuidor local de R-Biopharm para obtener mayor información.

## Garantía

R-Biopharm Rhône Ltd no ofrece garantías de ningún tipo, expresas o implícitas, excepto que todos los productos fabricados por R-Biopharm Rhône Ltd se fabrican con materiales de calidad adecuada. Si algún material está defectuoso, R-Biopharm Rhône Ltd proporcionará un producto de reemplazo. El usuario asume todo el riesgo y la responsabilidad resultante de la utilización de los productos y procedimientos de R-Biopharm Rhône Ltd. R-Biopharm Rhône Ltd no será responsable de ningún daño, incluidos los daños especiales o consecuentes, las pérdidas o los gastos que surjan directa o indirectamente de la utilización de los productos o procedimientos de R-Biopharm Rhône Ltd.



