

DONPREP[®]

Product Code: P50 / P50B

Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC or LC-MS/MS.
For in vitro use only.

P50/V17/25.11.21

www.r-biopharm.com



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Contents

	Page
Test Principle.....	4
Reagents Not Provided.....	4
Accessory Products.....	4
Hazards.....	4
Recommended Methods and Application Notes.....	4
Decontamination.....	5
Storage & Shelf Life.....	5
Sampling.....	5
Sensitivity.....	5
Recoveries.....	5
Column Preparation.....	5
Elution.....	6
HPLC Information.....	7
• Sample Preparation.....	7
• Cereal.....	7
• Animal Feed.....	8
• Preparation of Standards.....	9
• Calibration Curve.....	9
• Recommended HPLC Conditions.....	10
• HPLC Information - Typical Chromatogram.....	11
• Example HPLC Chromatogram for Cereal.....	11
• Example HPLC Chromatogram for Animal Feed.....	11
LC-MS/MS Information.....	12
• Sample Preparation.....	12
• Cereal.....	12
• Animal Feed.....	13
• Preparation of Standards.....	14
• Calibration Curve.....	14
• Recommended LC-MS/MS Conditions.....	15
• LC-MS/MS Information - Typical Chromatogram.....	16
• Example LC-MS/MS Chromatogram for Cereal (spiked at 20 ppb).....	16
• Example LC-MS/MS Chromatogram for Animal Feed (spiked at 5000 ppb).....	16
Quality.....	17
Technical Support.....	17
Warranty.....	17

Test Principle

The procedure is based on monoclonal antibody technology, which makes the test highly specific, sensitive, rapid and simple to perform.

The columns contain a gel suspension of monoclonal antibody specific to the toxin of interest. Following extraction of the toxin the sample extract is filtered, diluted and passed slowly through the immunoaffinity column. Any toxin which is present in the sample is retained by the antibody within the gel suspension. The column is washed to remove unbound material and the toxin is then released from the column following elution with solvent. The eluate is collected, evaporated and reconstituted prior to analysis by HPLC or LC-MS/MS.

The total extraction and clean-up time takes approximately 20 minutes to perform. The result is improved clean-up and concentration of the toxin from food and feed samples giving a much cleaner chromatogram and therefore providing more accurate and sensitive detection. The columns also have the added advantage that they can be automated for large scale analysis of samples.

Reagents Not Provided

- Distilled / Deionised Water (suitable for use with HPLC, e.g. MilliQ)
- Solvents (HPLC Grade Methanol and Acetonitrile)
- Deoxynivalenol Standard (Please refer to Preparation of Standards section)
- Sodium Hydroxide (to pH filtrate if required)
- Sodium Chloride

Accessory Products

- Whatman No. 113 or No. 4 Filter Paper
- Glass Microfibre Filter Paper
- Immunoaffinity Column Rack (CR1)*
- Immunoaffinity Column Accessory Pack (AP01)*

* Available from R-Biopharm. Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Hazards

Mycotoxins are very hazardous substances. Only laboratories equipped to handle toxic materials and solvents should perform analyses. Suitable protective clothing, including gloves, safety glasses and lab coats should be worn throughout the analysis.

Flammable solvents should be stored in an explosion-proof cabinet. Use a chemical hood and protective equipment as applicable.

Contact your local R-Biopharm distributor for a Material Safety Data Sheet for further information if required.

Recommended Methods and Application Notes

Methods are available for all matrices covered by legislation as well as additional commodities. Deviation from the methods described in our Instructions for Use and Application Notes may not achieve optimum results. Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Decontamination

Prior to disposal, excess standard solutions should be treated with at least one-tenth their volume of 5 % sodium hypochlorite. Labware and contaminated waste should be immersed in 5 % sodium hypochlorite solution for 30 minutes followed by the addition of 5 % acetone for 30 minutes. Flush with copious amounts of water before disposal. After decontamination labware should be thoroughly washed. Incinerate waste if regulations permit.

Storage & Shelf Life

The columns expire 18 months from date of manufacture if stored at 2 - 8 °C or 12 months from date of manufacture if stored at 21 - 25 °C. Do not freeze.

Ensure the column has not dried out and contains buffer above the gel. It is important to note the antibody included in the immunoaffinity column can be denatured by extreme temperature or pH change.

Sampling

A representative sample should be obtained by following one of the officially recognised sampling procedures. It is recommended that a minimum of 1 kg of representative sample is finely ground and a portion (5 - 50 g dependent on method used) of this is removed and extracted.

Sensitivity

The sensitivity is dependent on the final detection system employed by the analyst. However the test sensitivity may be improved if required by increasing the volume of sample passed through the immunoaffinity column. Please note the ratio of solvent to phosphate buffered saline (PBS) should be maintained.

Recoveries

If an analyst wishes to account for losses during extraction it is recommended a spiked sample of the same commodity type as the material being tested is analysed following the complete procedure as a reference standard. The recoveries obtained with the spiked sample can be used to correct the results obtained with the test sample.

Column Preparation

Immunoaffinity columns should be at ambient temperature before use. Remove the cap from the top of the column and discard. Firmly attach the column to a glass syringe barrel using an adapter and place in an immunoaffinity column rack or clamp stand.

Elution

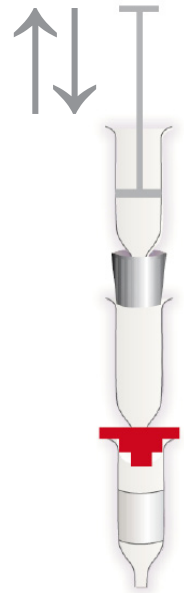
In order to fully elute the toxin/s from the immunoaffinity column it is vital that the solvent is in contact with the antibody within the gel suspension for a sufficient period of time. This ensures that all of the bonds between the antibody and the toxin are broken, ultimately releasing all of the toxin from the column for analysis with the detection system of choice

To ensure that the solvent is in contact with the antibody gel for a sufficient period of time any of the following elution methods can be used: -

Backflushing (this is the preferred method of choice at R-Biopharm): backflush by gently raising and lowering the syringe plunger during passage of the solvent through the column. This process will reverse the direction of flow of the eluate through the gel. This should be repeated 3 times before collecting the eluate. Proceed to the next step in the method.

Application of small volumes of solvent: apply the volume of solvent required for elution in two or three smaller aliquots. Allow each aliquot to remain in contact with the gel suspension for a minimum of 30 seconds before allowing each to pass fully through the gel suspension for collection. Proceed to the next step in the method.

Incubation with solvent: apply the full volume of solvent required for elution and allow 2-3 drops of the solvent to pass through the column for collection. Allow the remainder of the solvent to remain in contact with the gel suspension for a minimum of 60 seconds before allowing it to pass through the gel suspension for collection. Proceed to the next step in the method.



HPLC Information

• Sample Preparation - Cereal

This method has been tested on a number of cereals including wheat, barley, maize and cereal based products.

1. Weigh 25 g of ground sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 200 ml of water and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the sample through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Filter again through glass microfibre filter paper.
5. Pass 2 ml of the filtrate (equivalent to 0.25 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxin by the antibody.
6. Wash the column by passing 10 ml of water through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
7. Elute the toxin from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1.5 ml of 100 % methanol and collect in a glass tube. Please refer to the Elution section for further information.
8. Evaporate the eluate to dryness under air at 60 - 70 °C.
9. Reconstitute with 1 ml of 15 % methanol. Vortex for 20 seconds.
10. Inject 100 µl of reconstituted eluate onto the HPLC system.

HPLC Information

• Sample Preparation - Animal Feed

1. Weigh 25 g of ground sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 200 ml of water and blend at high speed for 2 minutes.
3. Centrifuge the sample at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Adjust pH to around 7.4 using 2 M sodium hydroxide.
5. Filter the supernatant through a glass microfibre filter paper.
6. If analysing at levels of 6,000 ppb or below, pass 2 ml of the filtrate (equivalent to 0.25 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxin by the antibody.

or

If analysing at levels of greater than 6,000 ppb, dilute 2 ml of the filtrate with 2 ml of water.

Pass 2 ml of the diluted filtrate (equivalent to 0.125 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxin by the antibody.

7. Wash the column by passing 10 ml of water through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
8. Elute the toxin from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1.5 ml of 100 % methanol and collect in a glass tube. Backflushing is recommended. Please refer to the Elution section for further information.
9. Evaporate the eluate to dryness under air at 60 - 70 °C.
10. Reconstitute with 1 ml of 15 % methanol. Vortex for 20 seconds.
11. Inject 100 µl of reconstituted eluate onto the HPLC system.

HPLC Information

Preparation of Standards

Preparation of 100,000 ng/ml deoxynivalenol stock solution:

1. Crystalline powder of deoxynivalenol can be purchased. Contact your local R-Biopharm distributor for further information. The powder is reconstituted as per the instructions provided and left overnight in the dark at room temperature to give a stock concentrate.
2. This is then used to prepare a 100,000 ng/ml deoxynivalenol stock solution.

Calibration Curve

It is recommended to run at least a 3 - 6 point calibration curve. In constructing a suitable curve the levels of the calibration standards should bracket or include the range of expected results. The diluted standard solutions should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

Example of how to prepare a six point calibration curve (can be modified according to legislative requirements or contamination levels):

1. Add 200 μ l of reconstituted crystalline standard to 800 μ l of 100 % acetonitrile (equivalent to 20,000 ng/ml).
2. Evaporate 200 μ l of the solution to dryness under air at 60 - 70 °C.
3. Standard 6: Reconstitute with 2 ml of 15 % methanol (equivalent to 2,000 ng/ml).
4. Standard 5: Take 1 ml of 2,000 ng/ml and add 1 ml of 15 % methanol (equivalent to 1,000 ng/ml).
5. Standard 4: Take 1 ml of 1,000 ng/ml and add 1 ml of 15 % methanol (equivalent to 500 ng/ml).
6. Standard 3: Take 1 ml of 500 ng/ml and add 1 ml of 15 % methanol (equivalent to 250 ng/ml).
7. Standard 2: Take 1 ml of 250 ng/ml and add 1 ml of 15 % methanol (equivalent to 125 ng/ml).
8. Standard 1: Take 1 ml of 125 ng/ml and add 1 ml of 15 % methanol (equivalent to 62.5 ng/ml).
9. Inject 100 μ l of each solution onto the HPLC system.

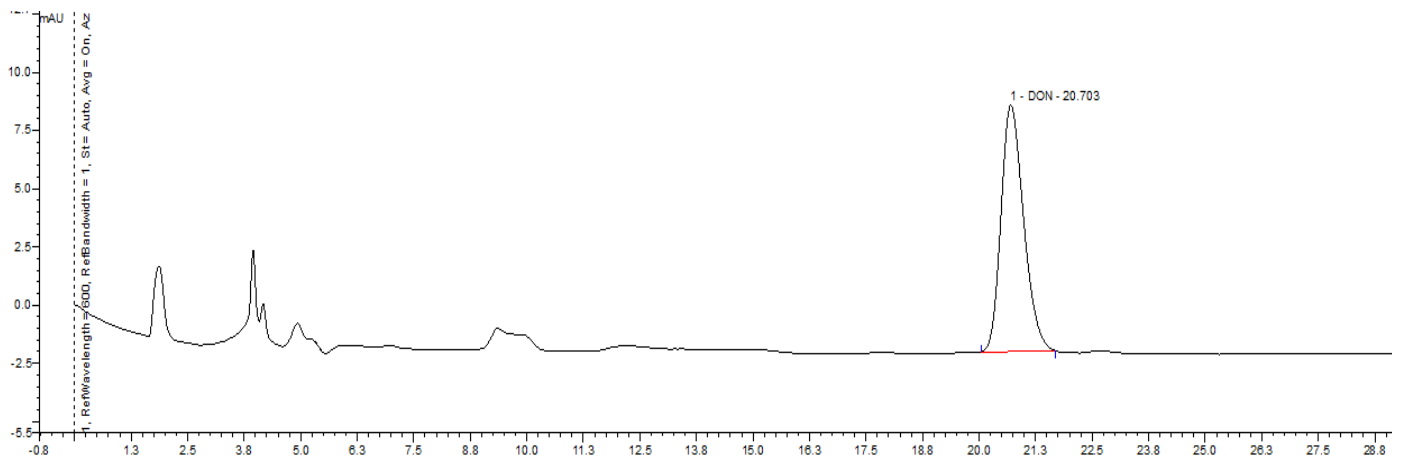
HPLC Information

Recommended HPLC Conditions

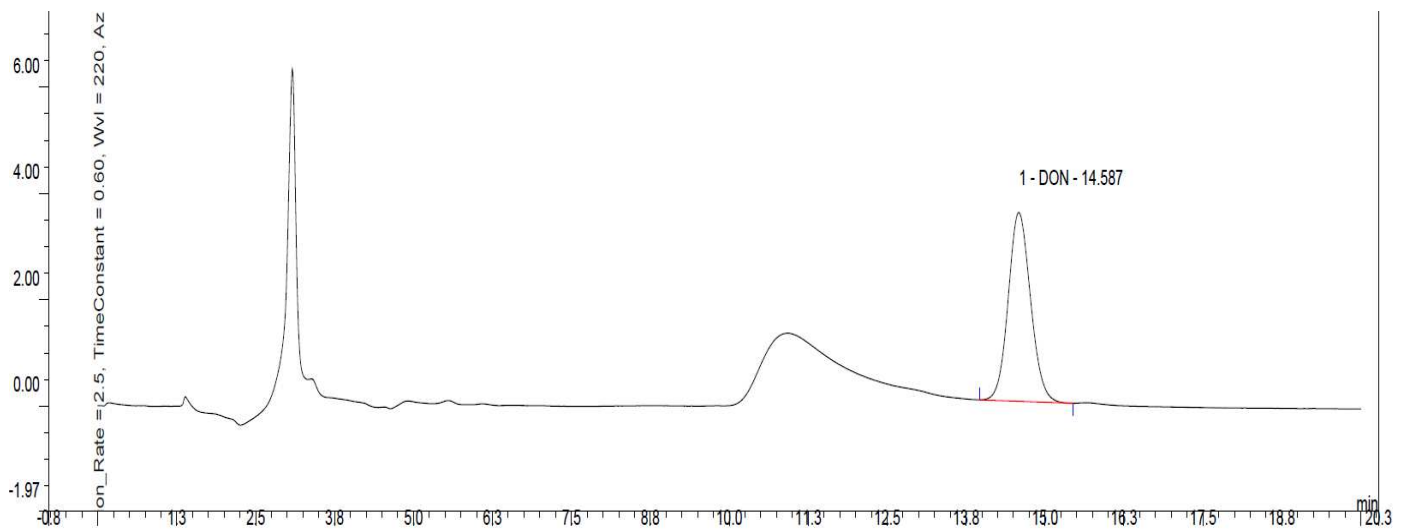
HPLC Conditions			
Guard Cartridge	AQUASIL C18 3 μ m, 4 mm x 10 mm or equivalent		
Analytical Column	AQUASIL C18 3 μ m, 4.6 mm x 150 mm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: Water Solution B: Methanol Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	85	15
	25	85	15
	26	50	50
	30	50	50
	31	85	15
	40	85	15
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.4 ml per minute		
UV Detector	220 nm		
Column Heater	Maintain guard and analytical column at 30 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injector	Autosampler / Rheodyne valve		
Injection Volume	100 μ l		

HPLC Information - Typical Chromatograms

- Example Chromatogram for Cereal



- Example Chromatogram for Animal Feed



LC-MS/MS Information

• Sample Preparation - Cereal

This method has been tested on a number of cereals including wheat, barley, maize and cereal based products.

1. Weigh 25 g of ground sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 200 ml of water and blend at high speed for 2 minutes.
3. Filter the sample through Whatman No. 113 or No. 4 filter paper, or centrifuge at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Filter again through glass microfibre filter paper.
5. Pass 2 ml of the filtrate (equivalent to 0.25 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxin by the antibody.
6. Wash the column by passing 10 ml of water through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
7. Elute the toxin from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1.5 ml of 100 % methanol and collect in a glass tube. Please refer to the Elution section for further information.
8. Following elution pass 1.5 ml of water through the column and collect in the same vial to give 3 ml total volume.
9. Inject 10 µl of eluate onto the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS Information

• Sample Preparation - Animal Feed

1. Weigh 25 g of ground sample and 5 g of sodium chloride into a 1 litre capacity, solvent resistant blender jar.
2. Add 200 ml of water and blend at high speed for 2 minutes.
3. Centrifuge the sample at 4,000 rpm for 10 minutes.
4. Adjust pH to around 7.4 using 2 M sodium hydroxide.
5. Filter the supernatant through a glass microfibre filter paper.
6. If analysing at levels of 6,000 ppb or below, pass 2 ml of the filtrate (equivalent to 0.25 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxin by the antibody.

or

If analysing at levels of greater than 6,000 ppb, dilute 2 ml of the filtrate with 2 ml of water.

Pass 2 ml of the diluted filtrate (equivalent to 0.125 g of sample) through the column at a flow rate of 2 ml per minute (or the sample can be allowed to pass through the column by gravity if preferred). A slow, steady flow rate is essential for the capture of the toxin by the antibody.

7. Wash the column by passing 10 ml of water through at a flow rate of approximately 5 ml per minute. Pass air through the column to remove residual liquid.
8. Elute the toxin from the column at a flow rate of 1 drop per second using 1.5 ml of 100 % methanol and collect in a glass tube. Backflushing is recommended. Please refer to the Elution section for further information.
9. Following elution pass 1.5 ml of water through the column and collect in the same vial to give 3 ml total volume.
10. Inject 10 µl of eluate onto the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS Information

Preparation of Standards

Preparation of 100,000 ng/ml deoxynivalenol stock solution:

1. Crystalline powder of deoxynivalenol can be purchased. Contact your local R-Biopharm distributor for further information. The powder is reconstituted as per the instructions provided and left overnight in the dark at room temperature to give a stock concentrate.
2. This is then used to prepare a 100,000 ng/ml deoxynivalenol stock solution.

Calibration Curve

It is recommended to run at least a 3 - 6 point calibration curve. In constructing a suitable curve the levels of the calibration standards should bracket or include the range of expected results. The diluted standard solutions should be prepared fresh on the day of analysis and used within a 24 hour period.

Example of how to prepare a six point calibration curve (can be modified according to legislative requirements or contamination levels):

1. Standard 6: Take 10 ml of 50 % methanol and remove 66.7 μ l to waste. Add 66.7 μ l of 100,000 ng/ml deoxynivalenol standard to give a concentration of 666.7 ng/ml.
2. Standard 5: Take 2 ml of Standard 6 and add 2 ml 50 % methanol (equivalent to 33.33 ng/ml)
3. Standard 4: Take 2 ml of Standard 5 and add 2 ml 50 % methanol (equivalent to 166.7 ng/ml)
4. Standard 3: Take 2 ml of Standard 4 and add 2 ml 50 % methanol (equivalent to 83.3 ng/ml)
5. Standard 2: Take 2 ml of Standard 3 and add 2 ml 50 % methanol (equivalent to 41.7 ng/ml)
6. Standard 1: Take 2 ml of Standard 2 and add 2 ml 50 % methanol (equivalent to 20.8 ng/ml)
7. Inject 10 μ l of each solution onto the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS Information

Recommended LC-MS/MS Conditions

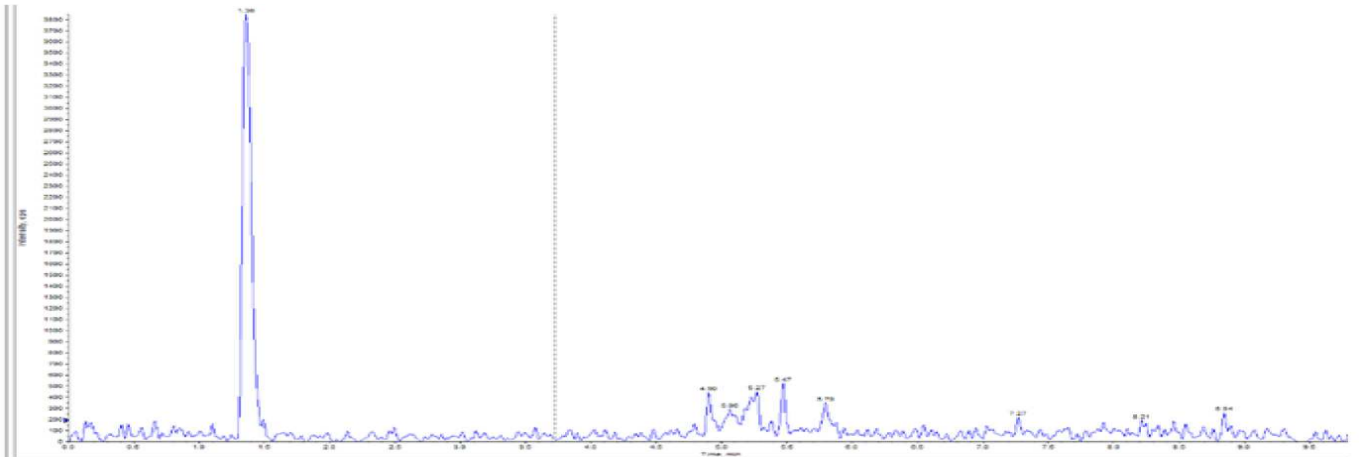
LC-MS/MS Conditions			
Analytical Column	Luna Omega Polar C18, 110 Å, 100 x 3 mm, 3 µm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: 1 mM Ammonium Formate + 0.1 % Formic Acid in 95:5 water : methanol Solution B: 1 mM Ammonium Formate + 0.1 % Formic Acid in 2:98 water : methanol Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time (min)	% Solution A	% Solution B
	0	60	40
	0.5	60	40
	4.0	0	100
	6.0	0	100
	6.1	60	40
	10	60	40
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.6 ml per minute		
Column Heater	Maintain guard and analytical column at 40 °C		
Integrator / Data Control System	From preferred supplier		
Injection Volume	10 µl		

Mass Spectrometry Conditions	
Instrument	Sciex QTRAP 5500
Mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Source Temperature	450 °C
Ion Spray	3500 V
IonSource Gas 1	50 psi
IonSource Gas 2	55 psi
Curtain Gas	50 psi

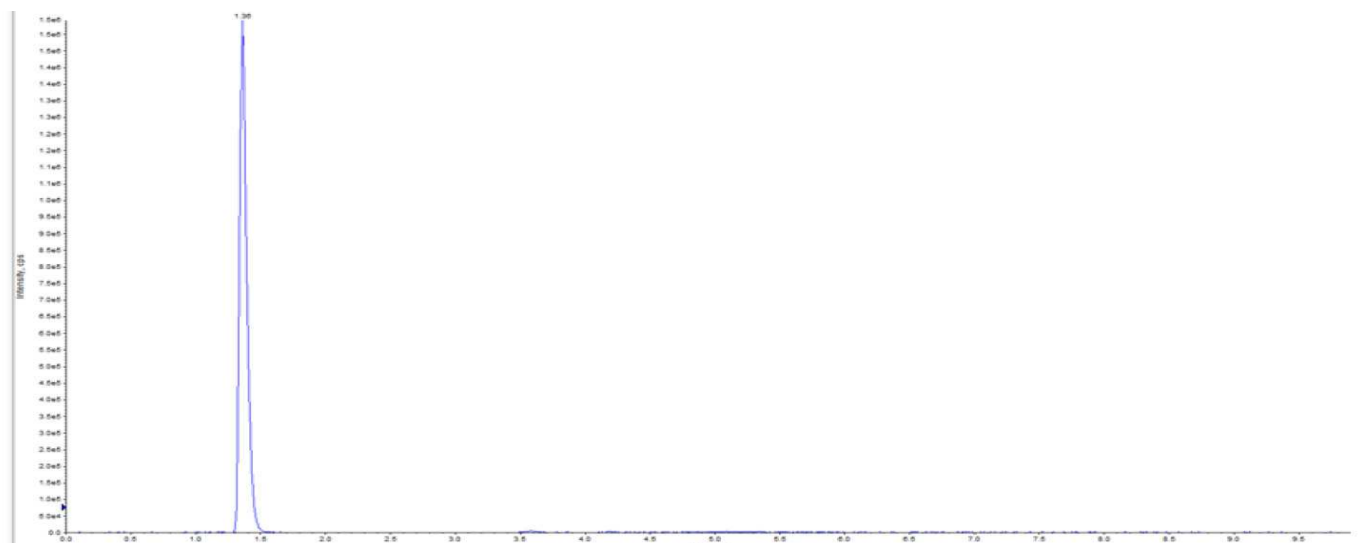
Instrument Setting						
Toxin	Time Segment (min)	Precursor Ion (m/z)	Product Ions (m/z)	Dwell Time (s)	Collision Energy (V)	Cell Exit Potential (V)
DON	1.36	297.1 [M+H] ⁺	249.00 (Quantifier) 231.00 (Qualifier)	20	15.00 17.00	16.00 15.00

LC-MS/MS Information - Typical Chromatograms

- Example Chromatogram for Cereal (spiked at 20 ppb)



- Example Chromatogram for Animal Feed (spiked at 5000 ppb)



Quality

RBR products are developed, manufactured, tested and dispatched under an ISO 9001 registered Quality Management System, guaranteeing a consistent product, which always meets our performance specifications. Our products have been used in many collaborative studies to develop standard European and International Methods and are widely used by key institutions, food companies and government laboratories. Customer references for RBR products are available on request..

Technical Support

RBR understand that from time to time users of our products may need assistance or advice. Therefore, we are pleased to offer the following services to our customers:

- Analysis of problem samples.
- Application notes for difficult samples.
- References from the RBR library.
- Installation and support of the KOBRA® CELL.
- Advice on detection parameters.
- Advice on preparation and handling of standards.
- Updates on legislation, sampling and other news by e-mail.
- Provision of spiked samples.

Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

Warranty

R-Biopharm Rhône Ltd makes no warranty of any kind, express or implied, except that all products made by R-Biopharm Rhône Ltd are made with materials of suitable quality. If any materials are defective, R-Biopharm Rhône Ltd will provide a replacement product. The user assumes all risk and liability resulting from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products and procedures. R-Biopharm Rhône Ltd shall not be liable for any damages, including special or consequential damages, loss or expense arising directly or indirectly from the use of R-Biopharm Rhône Ltd products or procedures.

DONPREP®

Art. Nr.: RBRP50 / RBRP50B

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

Inhalt

	Seite
Testprinzip	19
Nicht enthaltene Reagenzien	19
Zubehörprodukte	19
Gefahren	19
Empfohlene Methoden und Anwendungshinweise	19
Dekontamination	20
Lagerung und Mindesthaltbarkeit	20
Probennahme	20
Sensitivität	20
Wiederfindungen	20
Säulenvorbereitung	20
Elution	21
HPLC-Informationen	22
• Probenvorbereitung - Zerealie	22
• Probenvorbereitung - Tierfutter	23
• Zubereitung von Standards	24
• Kalibrierkurve	24
• Empfohlene HPLC-Bedingungen	25
• HPLC-Informationen – Typische Chromatogramme	26
• Beispiel-Chromatogramm für Zerealie	26
• Beispiel-Chromatogramm für Tierfutter	26
LC-MS/MS-Informationen	27
• Probenvorbereitung - Zerealie	27
• Probenvorbereitung - Tierfutter	28
• Zubereitung von Standards	29
• Kalibrierkurve	29
• Empfohlene LC-MS/MS-Bedingungen	30
• LC-MS/MS-Informationen – Typische Chromatogramme	31
• Beispiel-Chromatogramm für Zerealie (Dotierung bei 20 ppb)	31
• Beispiel-Chromatogramm für Tierfutter (Dotierung bei 5000 ppb)	31
Qualität	32
Technischer Support	32
Garantie	32

Testprinzip

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

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension des monoklonalen Antikörpers, der spezifisch für das jeweilige Toxin ist. Im Anschluss an die Extraktion des Toxins wird der Probenextrakt gefiltert, verdünnt und langsam durch die Immunitätsäule geleitet. Die in der Probe vorhandenen Toxine werden vom 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, evaporiert und rekonstituiert.

Die Extraktion und Reinigung dauert insgesamt ca. 20 Minuten. Das Ergebnis ist eine verbesserte Reinigung und Konzentration der Toxine aus Lebensmittel- und Futterproben, wodurch man ein viel saubereres 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 zur Verwendung mit HPLC, z. B. MilliQ)
- Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril mit HPLC-Qualität)
- Deoxynivalenol-Standard (siehe Abschnitt "Vorbereitung von Standards")
- Natriumhydroxid (zur pH-Einstellung, falls erforderlich)
- Natriumchlorid (zur Probenvorbereitung)

Zubehörprodukte

- Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier*
- Glasmikrofaserfilterpapier*
- Immunitätsäulenständer (RBRCR1)*
- Immunitätsäulen-Zubehörpaket (RBRAPO1)*

* 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 explosions sicheren 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 Herstellungsdatum, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden, bzw. von 12 Monaten ab dem Herstellungsdatum, 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 Immunaффinitätssäule 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 Immunaффinitätssäule geleiteten Probe erhöht wird.

Wiederfindung

Wenn ein Sie Verluste während der Extraktion berücksichtigen wollen, wird empfohlen, dass eine gespikete 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 Immunaффinitätssäulen sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Kappe vom oberen Ende der Säule entfernen und entsorgen. Die Säule mittels Adapter fest an einem Glasspritzenzylinder anbringen und in einen Immunaффinitätssäulen- oder einen Klemmständer stellen.

Elution

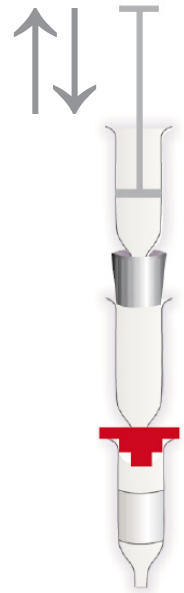
Um das/die Toxine/e vollständig aus der Immunaффinitätssäule zu eluieren, muss das Lösungsmittel lange genug mit dem Antikörper in der Gelsuspension in Kontakt sein. Dadurch wird sichergestellt, dass alle Bindungen zwischen dem Antikörper und dem Toxin aufgebrochen werden und so das gesamte Toxin aus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



HPLC-Informationen

• Probenvorbereitung - Zerealie

Diese Methode wurde an verschiedenen Getreidesorten, darunter Weizen, Gerste und Mais, sowie an getreidebasierten Produkten getestet.

1. 25 g gemahlene Probe zusammen mit 5 g Natriumchlorid in einen lösungsmittelresistenten Becher mit einer Kapazität von 1 Liter einwiegen.
2. 200 ml Wasser zugeben und die Probe 2 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit in einem Mixer mischen.
3. Die Probe durch Filterpapier (z.B. Whatman Nr. 113 oder Nr. 4) filtern oder bei 4.000 U/min 10 Minuten lang zentrifugieren.
4. Erneut durch ein Glasmikrofaserfilterpapier filtern.
5. 2 ml des Filtrats (äquivalent zu 0,25 g der Probe) auf die Säule aufgeben und mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute 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.
6. Die Säule mit 10 ml Wasser und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute waschen. Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
7. Das Toxin aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 1,5 ml 100 %igem Methanol eluieren und in einem Glasröhrchen auffangen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
8. Das Eluat bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 60 - 70 °C evaporieren.
9. Mit 1 ml 15 %igem Methanol rekonstituieren und 20 Sekunden lang vortexens.
10. 100 µl in das HPLC-System injizieren.

HPLC-Informationen

• Probenvorbereitung - Tierfutter

1. 25 g gemahlene Probe zusammen mit 5 g Natriumchlorid in einen lösungsmittelresistenten Becher mit einer Kapazität von 1 Liter einwiegen.
2. 200 ml Wasser zugeben und die Probe 2 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit in einem Mixer mischen.
3. Die Probe bei 4.000 U/min 10 Minuten lang zentrifugieren.
4. Mit 2 M Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von rund 7,4 einstellen.
5. Den Überstand durch ein Glasmikrofaserfilterpapier filtern.
6. Zur Analyse von Proben mit 6000 ppb oder weniger: 2 ml des Filtrats (äquivalent zu 0,25 g der Probe) auf die Säule aufgeben und mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute 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.

oder

Zur Analyse von Proben mit 6000 ppb oder höher verdünne 2 ml Filtrat mit 2 ml Wasser.

2 ml des verdünnten Filtrats (äquivalent zu 0,25 g der Probe) auf die Säule aufgeben und mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute 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.

7. Die Säule mit 10 ml Wasser und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute Wasser waschen. Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
8. Das Toxin aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 1,5 ml 100 %igem Methanol eluieren und in einem Glasröhrchen auffangen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
9. Das Eluat bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 60 - 70 °C evaporieren.
10. Mit 1 ml 15 %igem Methanol rekonstituieren und 20 Sekunden lang vortexen.
11. 100 µl in das HPLC-System injizieren.

HPLC-Informationen

Vorbereitung von Standards

Herstellen einer 100.000ng/ml Deoxynivalenol Stammlösung

1. Kristallines Pulver von Deoxynivalenol kann bei R-Biopharm AG erworben werden. Bitte wenden Sie sich an R-Biopharm AG, wenn Sie weitere Informationen erhalten möchten. Das Pulver wird entsprechend den mitgelieferten Anweisungen rekonstituiert und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine Stammlösung zu erhalten.
2. Diese Stammlösung kann nun benutzt werden um eine 100.000ng/ml Deoxynivalenol Standardlösung herzustellen.

Kalibrierkurve

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

Beispiel zur Vorbereitung einer 6-Punkte Kalibrierungskurve (kann je nach gesetzlichen Bestimmungen oder Verunreinigungslevel verändert werden):

1. 200 µl rekonstituierten kristallinen Standard zu 800 µl 100 % Acetonitril (äquivalent zu 20.000 ng/ml) zugeben.
2. 200 µl der Lösung bis zur Trockene unter einem Luftstrom bei 60 - 70 °C evaporieren.
3. Standard 6: Mit 2 ml einer 15 % Methanol Lösung (äquivalent zu 2.000 ng/ml) rekonstituieren.
4. Standard 5: 1 ml von der 2.000 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 15 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 1.000 ng/ml).
5. Standard 4: 1 ml von der 1.000 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 15 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 500 ng/ml).
6. Standard 3: 1 ml von der 500 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml 15 % Methanol zugeben (äquivalent zu 250 ng/ml).
7. Standard 2: 1 ml von der 250 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 15 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 125 ng/ml).
8. Standard 1: 1 ml von der 125 ng/ml Lösung nehmen und 1 ml einer 15 % Methanol Lösung zugeben (äquivalent zu 62,5 ng/ml).
9. 100 µl jeder Lösung in das HPLC-System injizieren.

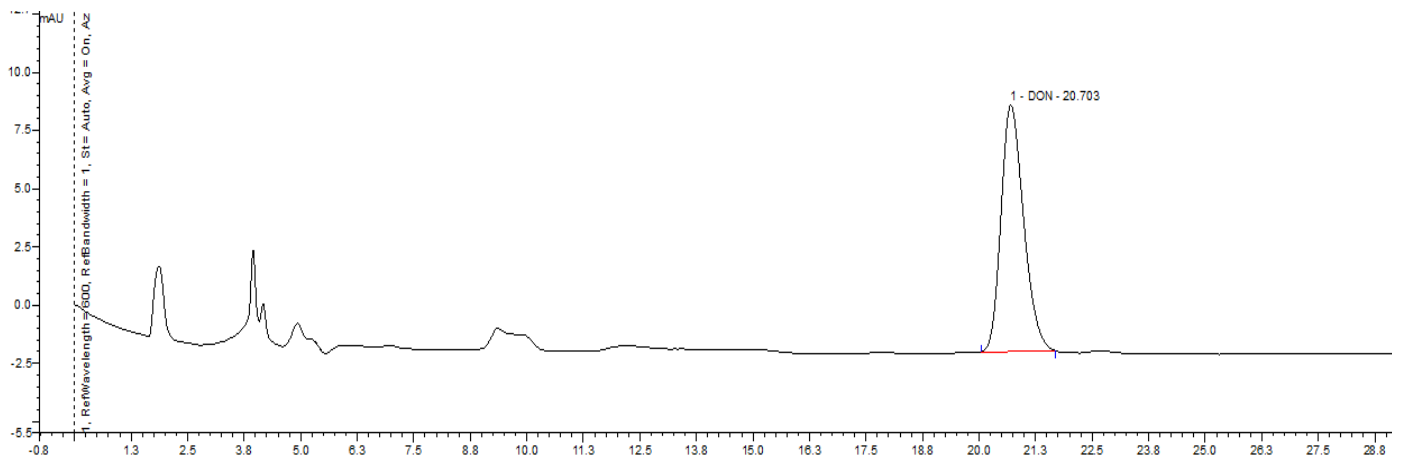
HPLC-Informationen

Empfohlene HPLC-Bedingungen

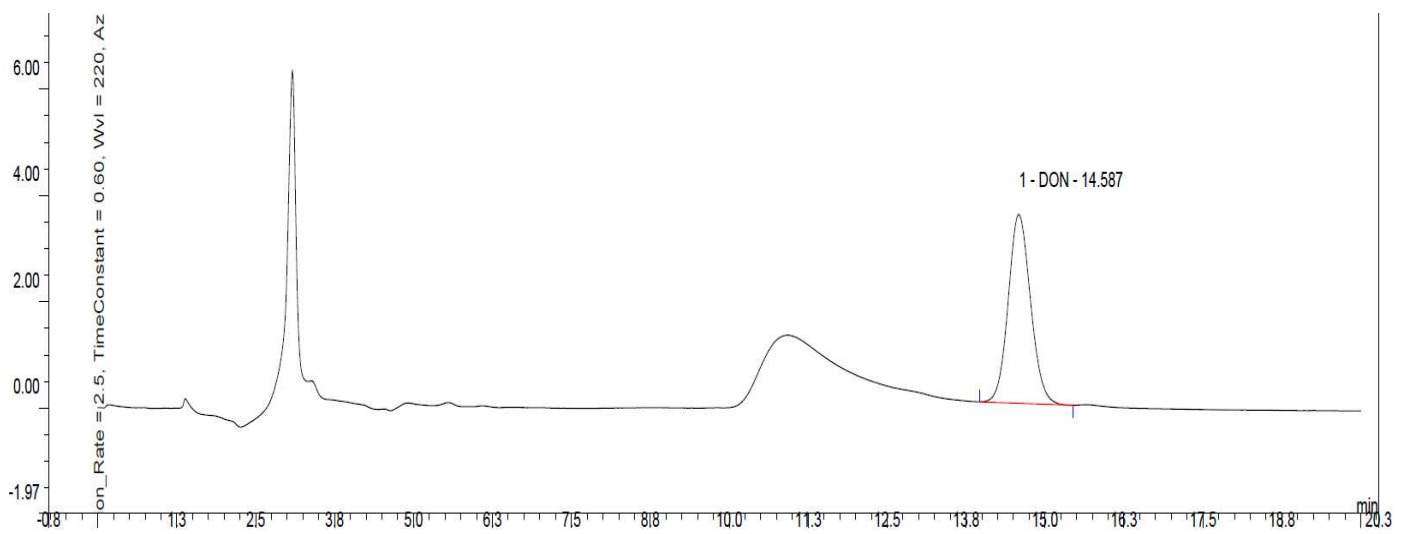
HPLC-Bedingungen			
Vorsäule	AQUASIL C18 3 µm, 4 mm x 10 mm oder Äquivalent		
Analytische Säule	AQUASIL C18 3 µm, 4.6 mm x 150 mm oder Äquivalent		
Mobile Phase	Lösung A: Wasser Lösung B: Methanol Frisch am Tag der Analyse vorbereiten.		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	85	15
	25	85	15
	26	50	50
	30	50	50
	31	85	15
	40	85	15
HPLC-Pumpe	Für mobile Phase		
Flussrate	0,4 ml pro Minute		
UV-Detektor / Wellenlänge	220 nm		
Säulenheizung	Hält die Vor- und die Analytische Säule bei 30 °C		
Integrator / Datenkontrollsystem	Von bevorzugtem Anbieter		
Injektor	Autosampler / Rheodyne-Ventil		
Injektionsvolumen	100 µl		

HPLC-Informationen – Typische Chromatogramme

- Beispiel-Chromatogramm für Zerealie



- Beispiel-Chromatogramm für Tierfutter



LC-MS/MS-Informationen

• Probenvorbereitung – Zerealie

Diese Methode wurde bei einer Reihe von Zerealien getestet, darunter Weizen, Gerste, Mais und zerealienbasierte Produkte.

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 sie 10 Minuten lang bei 4.000 U/min.
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. (Oder Sie können die Probe mittels Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, 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 hindurch laufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
7. Eluieren Sie das Toxin aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1,5 ml 100%igem Methanol und sammeln Sie es in einem Glasröhrchen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Elution“.
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.

LC-MS/MS-Informationen

• Probenvorbereitung - Tierfutter

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. (Oder Sie können die Probe mittels Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, falls bevorzugt.) Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Bindung des Toxins an 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. (Oder Sie können die Probe mittels Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, falls bevorzugt.) Eine langsame, gleichmäßige Flussrate ist für die Bindung des Toxins an den Antikörper unerlässlich.

7. Waschen Sie die Säule, indem Sie 10 ml Wasser mit einer Flussrate von ca. 5 ml pro Minute hindurch laufen lassen. Blasen Sie Luft durch die Säule, um restliche Flüssigkeit zu entfernen.
8. Eluieren Sie das Toxin aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mithilfe von 1,5 ml 100%igem Methanol und sammeln Sie es in einem Glasröhrchen. Eine Rückspülung wird empfohlen. 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.
10. Injizieren Sie 10 µl Eluat in das LC-MS/MS-System.

LC-MS/MS-Informationen

Zubereitung von Standards

Zubereitung einer Stammlösung von 100.000 ng/ml Deoxynivalenol:

1. Sie können kristallines Deoxynivalenol-Pulver kaufen. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihren R-Biopharm Vertriebspartner vor Ort. Das Pulver wird gemäß den beiliegenden Anweisungen rekonstituiert und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen, um ein Stammkonzentrat zu erhalten.
2. Dieses wird dann zur Herstellung einer Deoxynivalenol-Stammlösung von 100.000 ng/ml verwendet.

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

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 von Standard 6 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 33,33 ng/ml).
3. Standard 4: Nehmen Sie 2 ml von Standard 5 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 166,7 ng/ml).
4. Standard 3: Nehmen Sie 2 ml von Standard 4 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 83,3 ng/ml)
5. Standard 2: Nehmen Sie 2 ml von Standard 3 und fügen Sie 2 ml 50%iges Methanol hinzu (entspricht 41,7 ng/ml)
6. Standard 1: Nehmen Sie 2 ml von 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.

LC-MS/MS-Informationen

Empfohlene LC-MS/MS-Bedingungen

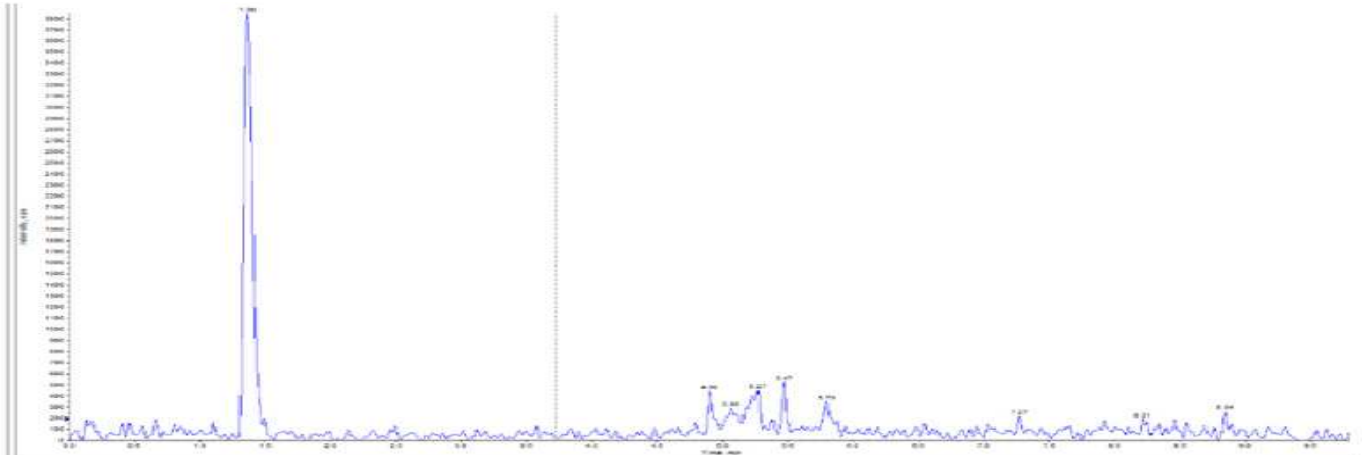
LC-MS/MS-Bedingungen			
Analytische Trennsäule	Luna Omega Polar C18, 110 Å, 100 x 3 mm, 3 µm oder gleichwertig		
Mobile Phase	Lösung A: 1 mM Ammoniumformat + 0.1 % Ameisensäure in 95 : 5 Wasser : Methanol Lösung B: 1 mM Ammoniumformat + 0.1 % Ameisensäure in 2 : 98 Wasser : Methanol Am Tag der Analyse frisch zubereiten.		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	60	40
	0,5	60	40
	4,0	0	100
	6,0	0	100
	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/ Datenkontrollsystem	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	Zeits- egment (min)	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ionen (m/z)	Verweilzeit (s)	Kollisions- energie (V)	Zellaus- gangs- Potential (V)
DON	1,36	297,1 [M+H] ⁺	249,00 (Quantifizierer) 231,00 (Qualifizierer)	20	15,00 17,00	16,00 15,00

LC-MS/MS-Informationen – Typische Chromatogramme

- Beispiel-Chromatogramm für Zerealie (Dotierung bei 20 ppb)



- Beispiel-Chromatogramm für Tierfutter (Dotierung bei 5000 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