



OchraStar™ - Immunoaffinity Columns

Item No. 10001968, 10001970



For the purification of Ochratoxin in conjunction with HPLC

PRODUCT DESCRIPTION

OchraStar™ - Immunoaffinity Columns are reliable and userfriendly, designed for rapid and simple purification of **Ochratoxin A** and **B** from extracts of foodstuffs. OchraStar™ - Immunoaffinity Columns contain monoclonal antibodies against Ochratoxin, which are covalently bound to gel-particles. Ochratoxin¹ is a metabolic product of the molds *Aspergillus* and *Penicillium*. Ochratoxin is highly toxic and carcinogenic.

INTENDED USE

OchraStar™ - Immunoaffinity Columns are intended for use with a wide range of commodities including milo, wheat, coffee and raisins.

For this process, a representative sample² of the commodity to be analysed is extracted with a mixture of solvent. For a sample to be considered representative Romer Labs recommends the use of the **Romer Analytical Sampling (RAS®) mill, or Series II® mill**. The extract is filtered and then diluted with a buffer. The diluted extract can be applied directly to the OchraStar™ - Immunoaffinity Column, in which the Ochratoxin is bound and separated from the other substances of the extract. After a short rinsing step it is possible to elute the isolated Ochratoxins.

This eluate is suited for determining the concentration of Ochratoxin directly by HPLC.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. Mycotoxins are highly toxic substances!
Please take care about protective measures³¹
2. Please decontaminate any equipment used with 4 % solution of sodium hypochlorite.
3. Each OchraStar™ - Immunoaffinity Column contains sodium azide.
4. Do not use the OchraStar™ - Immunoaffinity Columns after the expiration date indicated on the label.
5. OchraStar™ - Immunoaffinity Columns are designed for single use only.

RECOMMENDED SOLVENTS AND BUFFERS

PBS - buffer (pH 7.4)

Extraction solution:

60/40 (v/v) acetonitrile/water,

80/20 methanol/water,

1% sodium bicarbonate solution,

0.2 M ammonium acetate solution

methanol, HPLC-grade

All solvents and buffers should be at room temperature (+22 – 28 °C).

We recommend the use of **Biopure™ Ochratoxin standards**.

PROCEDURE

1) EXTRACTION

Grind a representative sample of the commodity. Various mixtures of solvents can be used for the extraction⁵ of Ochratoxins. Mixtures of **acetonitrile/water 60/40 (v/v), methanol/water 80/20 (v/v) or 1 % sodium bicarbonate** result in good recovery rates.

For solid samples:

1. Weigh out 25 g of sample into a 250 mL Erlenmeyer flask or a half-pint blender jar.
2. Add 100 mL of extraction solution and stopper flask or seal blender jar.
3. Blend on high speed for 3 minutes or in case of fine powder shake for 1 hour on a gyratory shaker.
4. Using a funnel, filter extract into a sample jar through filter paper. (e.g. Schleicher & Schüll 595)

Liquid samples can be diluted directly with PBS, without extraction. Any alcohol content in the sample must be considered in the calculation of the dilution, or the alcohol in the sample can be removed by evaporation if necessary.

2) DILUTION OF THE EXTRACTS

The extract is diluted with PBS until the content of acetonitrile is not higher than **10 % (v/v)**. In case of methanol the methanol content should not exceed **20 % (v/v)**.

E.g. 4 mL extract (methanol/water 80/20 v/v) with 12 mL total PBS is adequate. When sodium bicarbonate solutions are used for extraction, 4 mL of extract should be diluted with 4 mL PBS. Before applying it to the column the pH must be checked and if <7 adjusted to 7.4 by use of sodium hydroxide. Depending on the level of sensitivity, it is possible to carefully dry down an aliquot of the extract (f.i. 8 mL = 2 g sample) to a small residue (recommended equipment: Romer Evap®- System) and then dilute it with 10 mL PBS.

Please note: the pH of the extract should be neutral. If necessary, neutralize with NaOH-solution.

3) SAMPLE APPLICATION

The OchraStar™ - Immunoaffinity Column is put on an adapter. The column and the extract must be at room temperature. The column does not require rinsing before application of the diluted extract.

The OchraStar™ - Immunoaffinity Column usually drips independently. The adapter with the syringe barrel is attached. The diluted extract is applied and allowed to pass the column. The flow rate should not exceed 1 - 3 mL/min.

4) WASH

After the diluted extract has completely passed through, the column should be washed. The OchraStar™ - Immunoaffinity Column should be washed with **2 x 10 mL 0.2 M ammonium acetate solution**. Alternatively, the columns can also be washed with PBS. Please do not use distilled or deionized water. The first portion of the wash solution should be used to rinse the container.

Any remaining liquid should be removed from the column by applying slight pressure on top of the column or by applying vacuum in the bottom. Take care that the column does not dry completely.

5) ELUTION

The syringe barrel is removed from the OchraStar™ - Immunoaffinity Column and a suitable vial is placed under the column for the collection of the eluate. For the elution of bound Ochratoxin use only water free methanol (HPLC-grade). Elute with **1.5 – 3 mL methanol/acetic acid 98/2 (v/v)**, which should be applied to the column in several small portions (for example 3 x 0.5 mL). The methanol/acetic acid 98/2 (v/v) should be left on the column for a few seconds before starting elution to allow intensive contact with the gel. After the last portion is applied, the methanol still remaining in the column is removed, and added to the remaining eluate. The eluate can be directly analyzed by HPLC. In case of low-level contamination, the eluate can be dried down (for example with the Romer Evap®- System) and the residue can be redissolved in a small portion of mobile phase.

6) OPTIMIZATION FOR DIFFICULT SAMPLE MATRICES

For difficult sample matrices (for example cocoa-powder) extract, dilute, and apply extract to the column as described above. During the washing step, however, an additional rinse is necessary. **0.025 % Tween-20 in PBS** is recommended for rinsing. Usually **50 mL** of this solution is enough. The flow rate is similar to above. Following the application of 0,025 % Tween-20, it is necessary to rinse **with 5 mL 0.2 M ammonium acetate solution**. Any remaining liquid should be removed from the column. At the same time the column must not be allowed to dry.

Elution for a difficult sample matrix:

A clouding of the eluate is possible. This can be removed with an **addition of a small quantity of distilled water (10 % of elution volume)**. The volume must be taken into consideration when quantitating. If the water does not remove the clouding within the eluate, it may be necessary to filter. If filtration is required, the process must be checked with a control sample to ensure there is not a loss of recovery.

BIBLIOGRAPHIE

1. CAST (Council for Agricultural Science and Technology)-report, Mycotoxins Risks in Plant, Animal, and Human Systems, Jan. 2003
2. EC-Directive EC/401/2006, February 23rd 2006, EC-Directive EC/178/2010, March 2nd 2010, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs.
3. Tauchmann, F., *et al*; Alimenta 11, 85 (1972): protective measures

OchraStar™ - Immunoaffinity Column

FACT SHEET	12/2019
Product-Code:	10001968, 10001970
Packaging unit:	25 Immunoaffinity Columns
Gel Bed Volume:	0.3 mL
Specification:	Monoclonal antibodies against Ochratoxin A and B
Flow Rate:	1 – 3 mL/min
Storage:	2 – 8 °C, do not freeze!



OchraStar™ - Immunaффinitätssäulen

Bestell Nr. 10001968, 10001970



Zur Anreicherung von Ochratoxin für die HPLC-Analytik

PRODUKT-BESCHREIBUNG

Mit der OchraStar™ - Immunaффinitätssäule steht ein sicheres und anwendungsfreundliches Aufreinigungsverfahren zur Verfügung, welches eine schnelle und einfache Anreicherung sowie Isolierung von **Ochratoxin A** und **B** aus Futter- und Lebensmittel-Extrakten ermöglicht. OchraStar™ - Immunaффinitätssäulen enthalten monoklonale, ochratoxinspezifische Antikörper, welche kovalent an Gelpartikel gebunden sind. Bei Ochratoxinen₁ handelt es sich um hochtoxische, kanzerogene Stoffwechselprodukte der Pilze *Aspergillus* und *Penicillium*.

ANWENDUNGSPRINZIP

Die OchraStar™ - Immunaффinitätssäule kann für ein breites Probenspektrum eingesetzt werden, u.a. für Weizen, Kaffee und Trauben. Zunächst wird eine repräsentative Probe₂ (z.B. nach Zerkleinerung mit der **Romer Analytical Sampling (RAS®) Mühle**, oder der **Series II® Mühle**) mit einem Lösungsmittelgemisch extrahiert. Der Extrakt wird gefiltert, mit einem Puffer verdünnt und direkt über die OchraStar™ - Immunaффinitätssäule gegeben, wobei die Ochratoxine spezifisch gebunden und von den restlichen Störsubstanzen des Extraktes getrennt werden. Gebundenes Ochratoxin wird nach einem Waschschrift mit Methanol/Essigsäure 98/2 (v/v) eluiert. Dieses Eluat kann direkt für die Bestimmung des Ochrotoxingehaltes mit der HPLC eingesetzt werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Mykotoxine sind hochtoxische Substanzen!

Bitte treffen Sie geeignete Sicherheitsvorkehrungen!₃

1. Dekontaminieren Sie die verwendeten Geräte, z.B. mit einer 4 %igen Natriumhypochloritlösung
2. Jede OchraStar™-Immunaффinitätssäule enthält Natriumazid.
3. OchraStar™ - Immunaффinitätssäulen nach dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
4. OchraStar™ - Immunaффinitätssäulen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt.

EMPFOHLENE LÖSUNGSMITTEL, PUFFER UND STANDARDLÖSUNG

PBS - Puffer (pH 7.4)

Extraktionslösung:

60/40 (v/v) Acetonitril/Wasser,

80/20 Methanol/Wasser,

1 % Natriumbikarbonatlösung,

0,2 M Ammoniumazetatlösung.

Methanol, wasserfrei

Alle eingesetzten Lösungsmittel und Puffer sollten Raumtemperatur aufweisen (+22 – 28 °C).

Wir empfehlen **Ochratoxinstandards der Fa. Biopure™**.

DURCHFÜHRUNG

1) EXTRAKTION

Eine repräsentative Probe wird aus entsprechenden Mahl- oder anderen Zerkleinerungsvorgängen gewonnen. Als Extraktionslösung haben sich

Acetonitril/Wasser 60:40 (v/v)

Methanol/Wasser 80:20 (v/v) oder

1 % Natriumbikarbonatlösung bewährt, allerdings können auch andere Extraktionslösungen eingesetzt werden.

Feste Proben:

1. 25 g der zerkleinerten Probe in einen 250 mL Erlenmeyerkolben oder in ein Mixerglas einwiegen.
2. Zugabe von 100 mL Extraktionslösung und Gefäß luftdicht verschließen.
3. Probe mit Elektromischgerät (z.B. Blender) bei höchster Geschwindigkeit für 3 Minuten extrahieren oder im Falle von sehr feinem Pulver 1 Stunde schütteln.
4. Probe über einen Faltenfilter filtrieren.

Flüssige Proben können direkt in PBS verdünnt werden, wobei bei einer alkoholhaltigen Probe der Alkoholgehalt bei der Berechnung des Verdünnungsfaktors berücksichtigt werden muss. In der Probe befindlicher Alkohol kann auch vorher abgedampft werden.

2) VERDÜNNUNG DES EXTRAKTES

Anschließend wird der Extrakt mit PBS verdünnt, bis der Anteil an Acetonitril im Extrakt **10 % (v/v)** nicht übersteigt. Im Falle von Methanol, sollte der Anteil **20 % (v/v)** nicht übersteigen.

z.B.: 4 mL des klaren Methanol/Wasser - Extraktes

(1 g Probe) werden mit **12 mL PBS** verdünnt.

Wenn Natriumbikarbonatlösung zur Extraktion verwendet wird, sollten 4 mL dieses Extraktes mit 4 mL PBS verdünnt werden. Vor der Aufgabe muss der pH-Wert kontrolliert und im Falle eines pH-Wertes <7 mit Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt werden.

Sollen geringere Kontaminationen bestimmt werden, wird ein Aliquot (z.B. 8 mL = 2 g Probe) des unverdünnten Probenfiltrats bis auf den Wasseranteil eingeeengt (Romer EVAP™-System) und anschließend auf 10 mL PBS aufgefüllt. Bitte beachten Sie, dass der PH-Wert im Extrakt neutral zu sein hat, neutralisieren Sie gegebenenfalls bei sauren Proben mit einer NaOH-Lösung.

3) ANREICHERUNG

Die OchraStar™ - Immunaффinitätssäule wird auf einen verschlossenen Luer-Absperrhahn aufgesetzt. Sowohl die Säule als auch der Extrakt müssen Raumtemperatur haben. Ein Spülen der Säule vor der Aufgabe des verdünnten Extraktes ist nicht erforderlich. Nach dem Öffnen des Absperrhahns tropfen die Affinitätssäulen in der Regel selbständig. Ein geeignetes Vorratsgefäß mit Adapter wird auf die OchraStar™ - Immunaффinitätssäule aufgesetzt und der verdünnte Extrakt eingefüllt. Die Flußrate sollte 1 – 3 mL/min nicht überschreiten.

4) WASCHEN

Nachdem der Extrakt vollständig durchgelaufen ist, muss die Säule gewaschen werden. Dabei wird gleichzeitig das Vorratsgefäß ausgespült. Die OchraStar™ - Immunaффinitätssäule sollte **mit 2 x 10 mL 0,2 M Ammoniumazetatlösung** gewaschen werden. Alternativ kann auch mit PBS gewaschen werden. Bitte kein deionisiertes oder destilliertes Wasser verwenden!

In der Säule verbliebene Flüssigkeitsreste werden nach dem Waschen unter leichtem Druck von oben oder durch Unterdruck von unten entfernt. Die Säule darf dabei nicht austrocknen.

5) ELUTION

Das Vorratsgefäß wird von der OchraStar™ - Immunaффinitätssäule entfernt und eine geeignete Vorlage unter dem Auslauf der Immunaффinitätssäule gestellt (z.B. HPLC-vial, 3 mL). Für die Elution der gebundenen Ochratoxine ist nur wasserfreies Methanol (HPLC-grade) zu verwenden. Es wird mit einem Volumen von **1,5 – 3 mL Methanol/Essigsäure 98/2 (v/v)** eluiert. Das Methanol/Essigsäuregemisch wird in mehreren kleinen Portionen auf die Säule gegeben (z.B. 3 x 0,5 mL), man lässt es kurz einwirken und dann ablaufen. In der Säule verbliebene Methanolreste werden durch leichten Über- oder Unterdruck in die Vorlage eluiert.

Das Eluat kann direkt für die Injektion in die HPLC verwendet werden. Sollten sehr niedrige Kontaminationen bestimmt werden, kann das Eluat vorsichtig eingeeengt werden (z.B. mit dem Romer EVAP™-System) und in einem kleineren Volumen der mobilen Phase wieder aufgenommen werden.

6) OPTIMIERUNG BEI SCHWIERIGER PROBLEM-MATRIX

Für schwierige Probenmatrix, wie z.B. Kakaopulver, wird vorerst genau gleich - wie oben beschrieben - extrahiert, verdünnt und die Probe aufgetragen. Beim Waschen ist ein zusätzlicher Waschschrift notwendig. **0,025 % Tween20 in PBS in einer Gabe von 50 mL** ist hierbei empfehlenswert. Die Durchflussrate bleibt gleich. Nach Applizierung dieser Waschlösung ist mit 5 mL 0,2 M Ammoniumazetatlösung nachzuwaschen. In der Säule verbliebene Flüssigkeitsreste werden entfernt. Gleichzeitig ist darauf zu achten, dass die Säule nicht austrocknet.

Elution bei schwieriger Probenmatrix:

Eine Trübung des Eluat kann ev. durch **Zugabe von destilliertem Wasser (max. 10 % der Eluatmenge)** entfernt werden, dies muß allerdings bei der Quantifizierung berücksichtigt werden. Filtern Sie die Probe vorerst nicht. Falls allerdings durch die Wasserzugabe die Trübung nicht beseitigt werden kann, ist es notwendig die Probe zu filtrieren. Dieser Prozess muss durch eine Kontrollprobe abgesichert werden, um einen Verlust der Wiederfindung ausschließen zu können.

BIBLIOGRAPHIE

1. CAST (Council for Agricultural Science and Technology) – Report; Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems, Jan. 2003
2. EC-Directive EC/401/2006, February 23rd 2006, EC-Directive EC/178/2010, March 2nd 2010, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs.
3. Tauchmann, F., *et al*; Alimenta 11, 85 (1972): Schutzmaßnahmen beim Arbeiten mit Mykotoxinen (protective measures)

OchraStar™ - Immunoaffinity Column

PRODUKT-DATENBLATT	12/2019
Produkt-Code:	10001968, 10001970
Packungseinheit:	25 Immunaффinitäts-Säulen
Gelbett Volumen:	0.3 mL
Spezifität:	Monoklonale Antikörper gegen Ochratoxin A und B
Durchflussrate:	1 – 3 mL/min
Lagerung:	2 – 8 °C, nicht Einfrieren!