

# EASI-EXTRACT<sup>®</sup> VITAMIN B12

Product Code: P80 / P80B

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

P80/V21/03.09.18

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**



# Contents

## Page

Test Principle.....	4
Reagents Not Provided.....	4
Accessory Products.....	4
Recommended Methods and Application Notes.....	4
Hazards.....	5
Decontamination.....	5
Storage & Shelf Life.....	5
Sampling.....	5
Sensitivity.....	5
Recoveries.....	5
Column Preparation.....	6
Backflushing.....	6
Preparation of Solution A (Water Containing 0.025 % TFA).....	6
Preparation of 50 mM Sodium Acetate Buffer.....	6
Sample Preparation.....	7
• Infant Formula, Food and Energy Bars.....	7
• Milk.....	8
Preparation of Standards.....	9
Calibration Curve.....	9
Recommended HPLC Conditions.....	10
Example HPLC Chromatogram for Baby Food Composite.....	11
Example HPLC Chromatogram for Cow's Milk.....	11
Quality.....	12
Technical Support.....	12
Warranty.....	12

## 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 vitamin of interest. Following extraction of the vitamin the sample extract is diluted with buffer and filtered before being passed slowly through the immunoaffinity column. Any vitamin which is present in the sample is retained by the antibody within the gel suspension. The column is washed to remove any unbound material and the vitamin 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 2 hours to perform. The result is improved clean-up and concentration of the vitamin 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
- Solvents (HPLC Grade Methanol and Acetonitrile)
- Vitamin B12 Standard (Please refer to Preparation of Standards section)
- Sodium Acetate
- Pepsin\*
- Trifluoroacetic Acid (TFA)
- Potassium Cyanide or Sodium Cyanide
- Taka Diastase from *Aspergillus oryzae* ( $\alpha$ -amylase)\*
- Acetic Acid

\* Please note that it is advised to check all enzymes for natural vitamin content prior to analysis as they may contain traces of Vitamin B12.

## Accessory Products

- Whatman S&S 597½ 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.

## Recommended Methods and Application Notes

Methods are available for additional commodities. Deviation from the methods described in our Instructions For Use and Application Notes may not result in optimum results. Please contact your local R-Biopharm distributor for further information.

## Hazards

Sodium cyanide and potassium cyanide are highly toxic and can be corrosive to the gastrointestinal tract, skin, nose and eyes. Only laboratories equipped to handle toxic materials and solvents should perform analyses. Any steps involving sodium cyanide or potassium cyanide should be performed in a ventilated fume hood. 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.

## Decontamination

Glassware should be thoroughly washed and rinsed before use to avoid cross contamination.

Prior to disposal, excess sodium cyanide and potassium cyanide 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 have an expiry of 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 that the column has not dried out and contains buffer above the gel. It is important to note that the antibody included in the immunoaffinity column can be denatured by extreme temperature or pH change.

## Sampling

A representative sample should be obtained. It is recommended that the representative sample is finely ground and a portion (1 - 10 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.

For optimal column performance, taking into account the LOQ of a typical HPLC system, aim to load sample containing a quantity of 0.01 - 0.5 µg of vitamin B12 onto the column. Do not exceed a quantity of 1.0 µg as this is close to the capacity.

## Recoveries

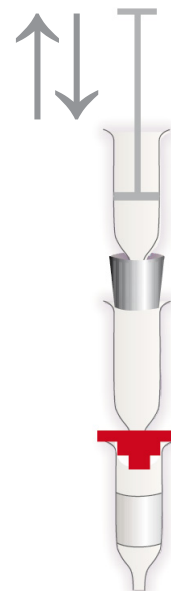
If an analyst wishes to account for losses during extraction it is recommended that a spiked sample of the same commodity type as the material being tested be analysed following the complete procedure as a reference standard. The recoveries obtained with the spiked sample can then be used to correct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

## Backflushing

Backflushing is carried out to increase the time the solvent is in contact with the antibody within the gel suspension ensuring that all of the vitamin is eluted. 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 eluant. This should be repeated 3 times.



## Preparation of Solution A (Water Containing 0.025 % TFA)

The solution should be prepared fresh on day of analysis.

1. Add 2 litres of water to a flask.
2. Remove 500  $\mu$ l to waste.
3. Add 500  $\mu$ l of trifluoroacetic acid (TFA).

## Preparation of 50 mM Sodium Acetate Buffer

The buffer can be kept for 5 days if stored at room temperature.

1. Weigh 4.1 g of sodium acetate into a flask.
2. Add 950 ml of water.
3. Adjust the pH to 4.0 using acetic acid.
4. Make up to 1 Litre with water and check that the pH is still 4.0.

## Sample Preparation

### • Infant Formula, Food and Energy Bars

1. Dependent on the commodity being analysed weigh the appropriate amount of ground sample into an amber glass screw cap bottle.

Commodity	Volume of Ground Sample
Infant formula and food (e.g. cereal, dairy, meat homogenate, baby food composite)	5 - 30 g
Energy bars	10 g

2. Add 50 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0).
3. Place on a magnetic stirrer and add 0.5 g of  $\alpha$ -amylase and 2 g of pepsin. Leave stirring for 10 minutes.
4. Add 1 ml of 1 % sodium cyanide solution or 1 ml of 1 % potassium cyanide solution and leave sample to stir for a further 5 minutes.
5. Incubate the sample in a shaking water bath at 37 °C for 30 minutes.
6. Transfer the sample to a second shaking water bath and incubate at 100 °C for 30 minutes. Remove the sample and allow to cool to room temperature.
7. Transfer the extract into a 100 ml amber volumetric flask and fill to the mark with 50 mM sodium acetate buffer.
8. Filter the sample through a Whatman S&S 597½ filter paper.
9. Dependent on the commodity being analysed pass the appropriate volume of filtrate through the column according to the table below. Pass the filtrate 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 vitamin by the antibody.

Commodity	Volume of Filtrate
Infant formula	5 - 10 ml
Food (e.g. cereal, dairy, meat homogenate, baby food composite)	15 - 30 ml
Energy bars	20 - 25 ml

10. 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.
11. Elute the vitamin from the column at a flow rate of 1 drop per second using 3 ml of 100 % methanol and collect in a glass tube. Backflushing is recommended. Please refer to Backflushing section for further information.
12. Evaporate the eluate to dryness under air at 60 - 70 °C.
13. Reconstitute with 300  $\mu$ l of solution A. Vortex for 20 seconds.
14. Inject 100  $\mu$ l onto the HPLC system.

## Sample Preparation

### • Milk

1. Measure 30 ml of sample into an amber glass screw cap bottle.
2. Add 50 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0).
3. Place on a magnetic stirrer and add 0.25 g of  $\alpha$ -amylase and 1 g of pepsin. Leave stirring for 10 minutes.
4. Add 1 ml of 1 % sodium cyanide solution or 1 ml of 1 % potassium cyanide solution and leave sample to stir for a further 5 minutes.
5. Incubate the sample in a shaking water bath at 37 °C for 30 minutes.
6. Transfer the sample to a second shaking water bath and incubate at 100 °C for 30 minutes. Remove the sample and allow to cool to room temperature.
7. Transfer the extract into a 100 ml amber volumetric flask and fill to the mark with 50 mM sodium acetate buffer.
8. Filter the sample through a Whatman S&S 597½ filter paper.
9. Dependent on the commodity being analysed pass the appropriate volume of filtrate through the column according to the table below. Pass the filtrate 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 vitamin by the antibody.

Commodity	Volume of Filtrate
Cow's milk, soya milk	10 ml
Long life UHT milk	20 ml

10. 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.
11. Elute the vitamin from the column at a flow rate of 1 drop per second using 3 ml of 100 % methanol and collect in a glass tube. Backflushing is recommended. Please refer to the Backflushing section for further information.
12. Evaporate the eluate to dryness under air at 60 - 70 °C.
13. Reconstitute with 300  $\mu$ l of solution A. Vortex for 20 seconds.
14. Inject 100  $\mu$ l onto the HPLC system.



## Preparation of Standards

Powdered cyanocobalamin can be purchased. The powder is dissolved to give a concentration of 1,000 µg/ml. Leave overnight at 2 - 8 °C to give a stock solution. All standards should be prepared in amber glassware.

## 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.

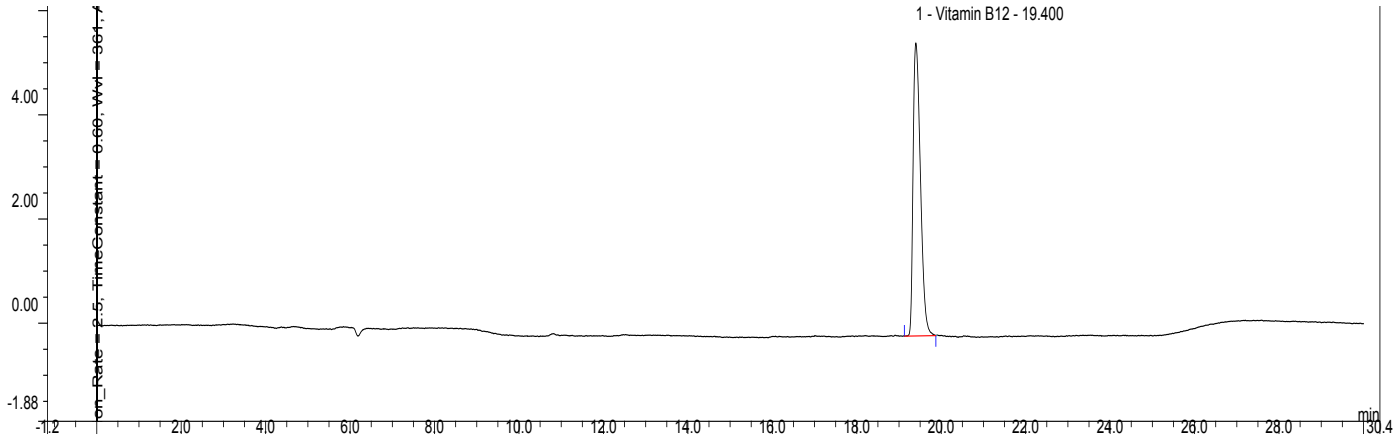
Example of how to prepare a four point calibration curve (can be modified according to expected vitamin content):

1. Take 100 ml of water and remove 1 ml to waste.
2. Add 1 ml of 1 mg/ml cyanocobalamin standard to give a 10 µg/ml cyanocobalamin solution.
3. Standard 4: Take 8 ml of solution A and remove 120 µl to waste. Add 120 µl of 10 µg/ml solution (equivalent to 0.15 µg/ml).
4. Standard 3: Take 1 ml of 0.15 µg/ml and add 1 ml of solution A (equivalent to 0.075 µg/ml).
5. Standard 2: Take 1 ml of 0.075 µg/ml and add 1 ml of solution A (equivalent to 0.0375 µg/ml).
6. Standard 1: Take 1 ml of 0.0375 µg/ml and add 1 ml of solution A (equivalent to 0.01875 µg/ml).
7. Inject 100 µl of each solution onto the HPLC system.

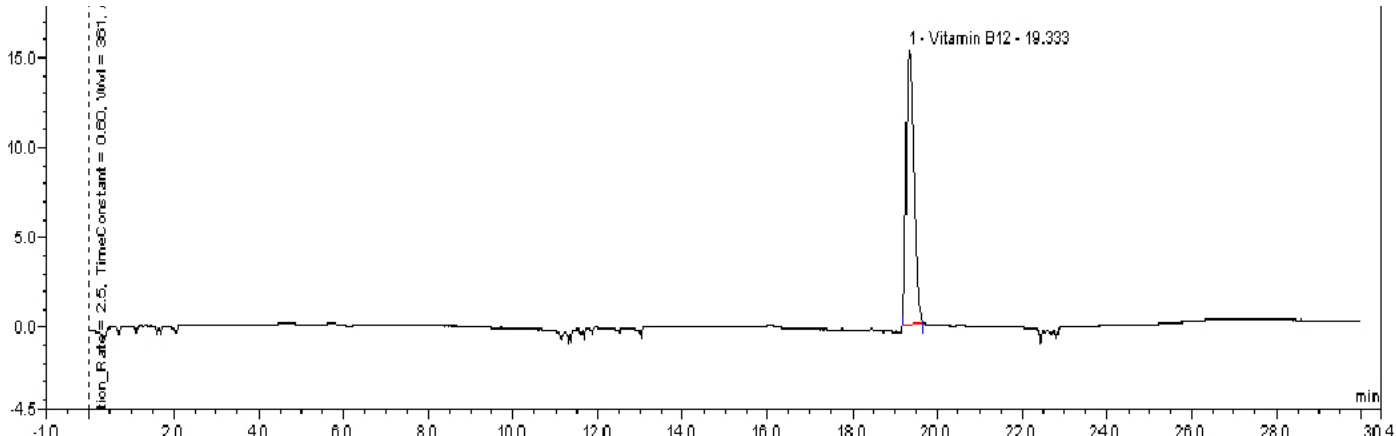
## Recommended HPLC Conditions

HPLC Conditions			
Guard Cartridge	ACE 3 AQ 3 µm, 4 mm x 10 mm or equivalent		
Analytical Column	C18 ACE 3 AQ 3 µm, 3 mm x 150 mm or equivalent		
Mobile Phase	Solution A: 0.025 % TFA in Water (pH 2.6) Solution B: Acetonitrile Prepare fresh on day of analysis.		
Gradient Conditions	Time	% Solution A	% Solution B
	0	100	0
	0.5	100	0
	11	85	15
	19	75	25
	20	90	10
	26	100	0
	30	100	0
HPLC Pump	To deliver mobile phase		
Flow Rate	0.25 ml per minute		
UV Detector	361 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 µl		

### Example HPLC Chromatogram for Baby Food Composite



### Example HPLC Chromatogram for Cow's Milk



## 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.

# EASI-EXTRACT® VITAMIN B12

Art. Nr.: RBRP80 / RBRP80B

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

## Inhalt

## Seite

Testprinzip .....	14
Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien .....	14
Zubehörprodukte .....	14
Empfohlene Methoden und Applikationen .....	14
Gefahren .....	15
Dekontamination .....	15
Lagerung und Haltbarkeit .....	15
Probennahme .....	15
Sensitivität .....	15
Wiederfindung .....	16
Säulenvorbereitung .....	16
Rückspülung .....	16
Vorbereitung von Lösung A (Wasser mit einem Gehalt von 0,025 % TFA) .....	16
Vorbereitung von 50 mM Natriumacetatpuffer .....	16
Probenvorbereitung .....	17
• Säuglingsanfangsnahrung und Kleinkindernahrung .....	17
• Milch .....	18
Vorbereitung von Standards .....	19
Kalibrierkurve .....	19
Empfohlene HPLC-Bedingungen .....	20
Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Babynahrung .....	21
Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Kuhmilch .....	21
Qualität .....	22
Technische Unterstützung .....	22
Garantie .....	22

## 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 Vitamin ist. Im Anschluss an die Extraktion des Vitamins wird der Probenextrakt mit Puffer verdünnt, filtriert und langsam durch die Immunaffinitätssäule geleitet. Die in der Probe vorhandenen Vitamine werden vom Antikörper in der Gelsuspension gebunden. Die Säule wird anschließend gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen, darauf hin wird das Vitamin mit 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. 2 Stunden. Das Ergebnis ist eine verbesserte Reinigung und Konzentration des Vitamins aus Lebensmittel- und Futtermittelproben, 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
- Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril HPLC-Qualität)
- Vitamin B12-Standard (siehe Abschnitt „Vorbereitung von Standards“)
- Natriumacetat
- Pepsin\*
- Trifluoressigsäure (TFA)
- Kaliumcyanid oder Natriumcyanid
- Takadiastase aus *Aspergillus oryzae* ( $\alpha$ -Amylase)\*
- Essigsäure

\* Bitte beachten. Es wird empfohlen alle Enzyme vor dem Einsatz auf den natürlichen Gehalt von Vitamin B12 zu überprüfen.

## Zubehörprodukte

- Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier\*
- Immunaffinitätssäulenständer (RBRCR1)\*
- Immunaffinitätssäulen-Zubehörpaket (RBRAP01)\*

\* Erhältlich bei R-Biopharm AG.

## Empfohlene Methoden und Applikationen

Für alle unter der gesetzlichen Rechtsvorschrift stehenden Matrices und Rohstoffe stehen Applikationen bereit und auch für einige weitere Rohstoffe sind Methoden auf Anfrage verfügbar. Veränderungen oder Abweichungen bei der Handhabung der beschriebenen Durchführungsanweisungen des Handbuchs können zu einem nicht optimalen Ergebnis führen. Bitte wenden Sie sich an die R-Biopharm AG wenn sie weitere Informationen benötigen.

## Gefahren

Natriumcyanid und Kaliumcyanid sind hochtoxisch und kann korrosiven an den Gastrointestinaltrakt, Haut, Nase und Augen. Analysen sollten nur von Laboren durchgeführt werden, die über die entsprechende Ausrüstung zur Handhabung toxischer Substanzen und Lösungsmittel verfügen. Alle Schritte mit Natriumcyanid oder Kaliumcyanid sollte in einem gut belüfteten Abzug durchgeführt werden. Während der Analyse ist geeignete Schutzkleidung einschließlich Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel zu tragen.

Entzündliche Lösungsmittel müssen in einem explosionsicheren 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.

## Dekontamination

Laborgeräte aus Glas sollten vor dem Gebrauch gründlich gewaschen und gespült werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

Überschüssiges Kaliumcyanid oder Natriumcyanid sollte vor der Entsorgung mit mindestens einem Zehntel ihres Volumen mit 5 % Natriumhypochlorit verdünnt werden. Laborgeräte und Abfälle, die mit Kaliumcyanid oder Natriumcyanid in Kontakt kamen, sollten in eine 5 % Natriumhypochlorit-Lösung für 30 Min eingetaucht werden. Nach der Inkubation eine 5 % Aceton-Lösung hinzugeben und weitere 30 Min inkubieren. Nach der Dekontamination und vor dem Entsorgen oder reinigen sollten die Gegenstände gründlich mit Wasser abgespült werden. Wenn es die Richtlinien erlauben oder vorschreiben, sollten die Abfälle verbrannt werden.

## 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.

## Probenahme

Eine repräsentative Probe sollte entnommen werden. Es wird empfohlen, dass die repräsentative Probe fein gemahlen und ein Teil (1 - 10 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.

Um eine optimale Säulenleistung zu erhalten, wird unter Berücksichtigung der Quantifizierungsgrenze eines typischen HPLC-Systems eine Probe mit einem Gehalt von 0,01 - 0,5 µg Vitamin B12 auf die Säule aufgeben. Nicht die Konzentration von 1,0 µg überschreiten, da diese nahe der Säulenkapazität ist.

## Wiederfindung

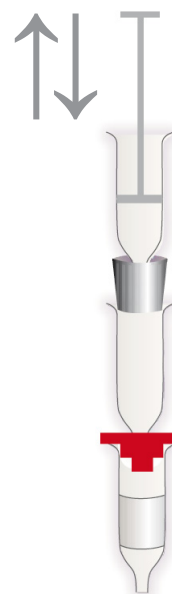
Wenn ein Sie Verluste während der Extraktion berücksichtigen wollen, wird empfohlen, dass eine gespikete Probe der gleichen Matrix wie die zu analysierende Probe gemäß dem kompletten Verfahren wie ein Referenzstandard analysiert wird. Die mit der gespikten Probe erhaltene Wiederfindung kann dann verwendet 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.

## Rückspülung

Die Rückspülung wird durchgeführt, um die Zeit zu erhöhen, in der das Lösungsmittel mit dem Antikörper in der Gelsuspension in Kontakt ist. Somit wird sichergestellt, dass das Toxin vollständig eluiert wird. Die Rückspülung wird durchgeführt, indem der Spritzenkolben während des Durchlaufs des Lösungsmittels durch die Säule sanft angehoben und abgesenkt wird. Dieser Prozess kehrt die Richtung des Eluatflusses um und sollte 3 Mal wiederholt werden.



## Vorbereitung von Lösung A (Wasser mit einem Gehalt von 0,025 % TFA)

Die Lösung sollten am Tag des Einsatzes frisch vorbereitet.

1. 2 Liter Wasser in einen Kolben geben.
2. 500 µl entnehmen und verwerfen.
3. 500 µl Trifluoressigsäure (TFA) zugeben.

## Vorbereitung von 50 mM Natriumacetatpuffer

Der puffer kann für bis zu 5 Tage aufbewahrt werden, wenn er bei Raumtemperatur gelagert wird.

1. 4,1 g Natriumacetat in einen Kolben einwiegen.
2. 950 ml Wasser zugeben.
3. Den pH-Wert mit Essigsäure auf pH 4,0 einstellen.
4. Mit Wasser bis auf 1 Liter auffüllen und prüfen, ob der pH-Wert immer noch bei pH 4,0 istliegt.



## Probenvorbereitung

### • Auf Getreide basierende Säuglings- und Kleinkind-Nahrung

1. 5 - 30 g gemahlene Probe in eine Braunglasflasche mit Schraubkappe einwiegen.
2. 50 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,0) zugeben.
3. 0,5 g der  $\alpha$ -Amylase und 2 g Pepsin zugeben, die Lösung auf einen Magnetrührer stellen und 10 min mischen lassen.
4. 1 ml der 1 % Natriumcyanid-Lösung hinzugeben (Alternativ: 1 ml einer 1 % Kaliumcyanid-Lösung) und weitere 5 min mischen.
5. Die Probe in einem Schüttelwasserbad 30 min lang bei 37 °C inkubieren.
6. Die Probe in ein zweites Schüttelwasserbad geben und 30 min lang bei 100 °C inkubieren. Die Probe entnehmen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
7. Den Extrakt in einen 100 ml Braunglas-Messkolben geben und bis zur Markierung mit 50 mM Natriumacetatpuffer auffüllen.
8. Die Probe filtrieren (z. B. durch ein Whatman S&S 597½ Filterpapier).
9. Das entsprechende Filtratvolumen (je nach der zu analysierenden Probe) entsprechend der nachstehenden Tabelle auf die Säule aufgeben. Das Filtrat 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 Vitamin vom Antikörper gebunden wird.

Zu analysierende Probe	Filtratvolumen
Säuglingsanfangsnahrung	5 - 10 ml
Nahrung (z. B. Getreide, Milchprodukte, Fleischhomogenat, Babynahrung)	15 - 30 ml

10. Die Säule mit 10 ml Wasser und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute waschen. Anschließend Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
11. Das Vitamin aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 3 ml 100 % Methanol eluieren und in einem 5 ml Glasröhrchen auffangen. Eine Rückspülung wird empfohlen. Siehe Abschnitt „Rückspülung“ für weitere Informationen.
12. Das Eluat bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 60 - 70 °C evaporieren.
13. Mit 300 µl von der Lösung A rekonstituieren und 20 Sekunden lang vortexen.
14. 100 µl in das HPLC-System injizieren.

## Probenvorbereitung

### • Milch

1. 30 ml Probe in eine Braunglasflasche mit Schraubkappe einwiegen.
2. 50 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,0) zugeben.
3. 0,25 g der  $\alpha$ -Amylase und 1 g Pepsin zugeben, die Lösung auf einen Magnetrührer stellen und 10 min mischen lassen.
4. 1 ml der 1 % Natriumcyanid-Lösung hinzugeben (Alternativ: 1 ml einer 1 % Kaliumcyanid-Lösung) und weitere 5 min mischen.
5. Die Probe in einem Schüttelwasserbad 30 min lang bei 37 °C inkubieren.
6. Die Probe in ein zweites Schüttelwasserbad geben und 30 min lang bei 100 °C inkubieren. Die Probe entnehmen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
7. Den Extrakt in einen 100 ml Braunglas-Messkolben geben und bis zur Markierung mit 50 mM Natriumacetatpuffer auffüllen.
8. Die Probe filtrieren (z. B. durch ein Whatman S&S 597½ Filterpapier).
9. Das entsprechende Filtratvolumen (je nach der zu analysierenden Probe) entsprechend der nachstehenden Tabelle auf die Säule aufgeben. Das Filtrat 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 Vitamin vom Antikörper gebunden wird.

Zu analysierende Probe	Filtratvolumen
Kuhmilch, Sojamilch	10 ml
H-Milch	20 ml

10. Die Säule mit 10 ml Wasser und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute waschen. Anschließend Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
11. Das Vitamin aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 3 ml 100 % Methanol eluieren und in einem 5 ml Glasröhrchen auffangen. Eine Rückspülung wird empfohlen. Siehe Abschnitt „Rückspülung“ für weitere Informationen.
12. Das Eluat bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 60 - 70 °C evaporieren.
13. Mit 300 µl von der Lösung A rekonstituieren und 20 Sekunden lang vortexen.
14. 100 µl in das HPLC-System injizieren.

## Vorbereitung von Standards

Cyanocobalamin-Pulver kann käuflich bei verschiedenen Herstellern erworben werden. Das Pulver wird aufgelöst, um eine Konzentration von 1.000 µg/ml zu erhalten. Über Nacht bei 2 - 8 °C stehen lassen, um eine Stammlösung zu erhalten. Alle Standards sollten in Braunglasflaschen präpariert werden.

## 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.

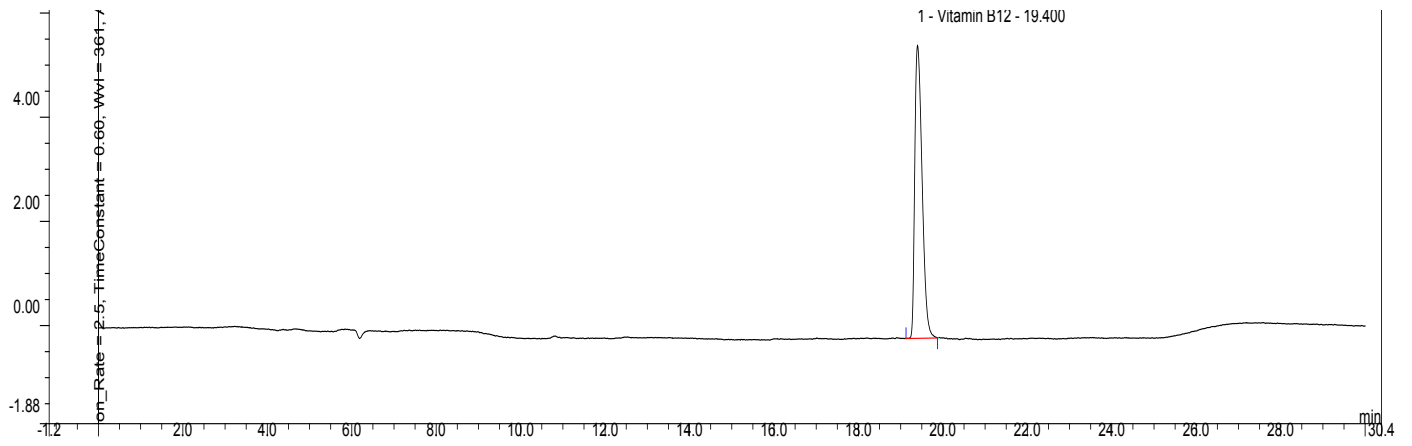
Beispiel der Herstellung einer vier Punkt Kalibrierkurve. (Diese kann je nach erwarteter Vitaminkonzentration angepasst werden):

1. Von 100 ml Wasser 1 ml abnehmen und verwerfen.
2. 1 ml vom 1 mg/ml Cyanocobalamin-Standard zugeben, um eine Cyanocobalamin-Lösung von 10 µg/ml zu erhalten.
3. Standard 4: 8 ml von der Lösung A nehmen und 120 µl entfernen und verwerfen. 120 µl von der 10 µg/ml Lösung (äquivalent zu 0,15 µg/ml) zugeben.
4. Standard 3: 1 ml von der 0,15 µg/ml Lösung nehmen und 1 ml von der Lösung A zugeben (äquivalent zu 0,075 µg/ml).
5. Standard 2: 1 ml von der 0,075 µg/ml Lösung nehmen und 1 ml von der Lösung A zugeben (äquivalent zu 0,0375 µg/ml).
6. Standard 1: 1 ml von der 0,0375 µg/ml Lösung nehmen und 1 ml von der Lösung A zugeben (äquivalent zu 0,01875 µg/ml).
7. 100 µl jeder Lösung als Eichkurve in das HPLC-System injizieren.

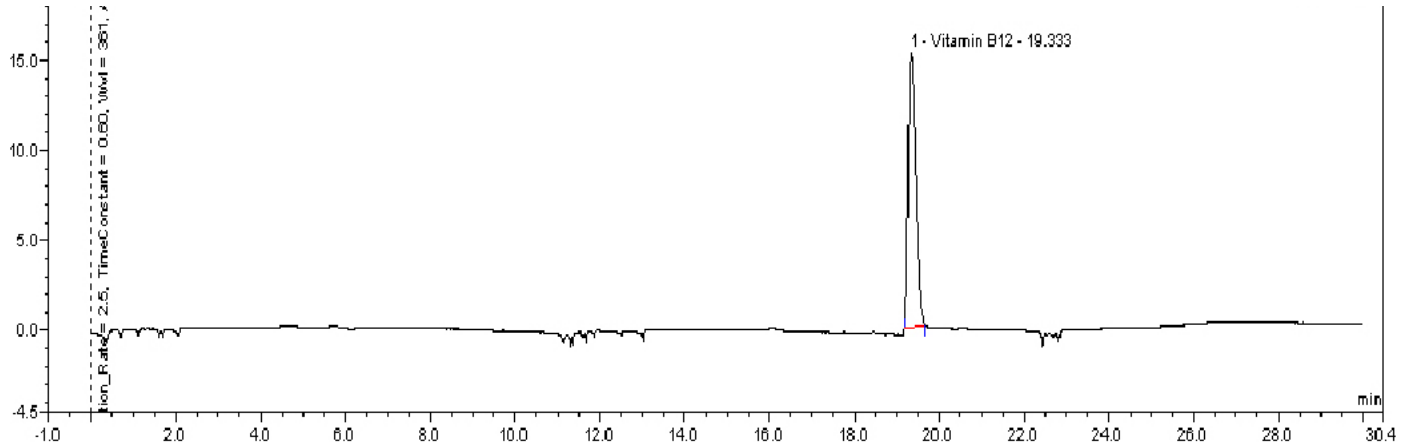
## Empfohlene HPLC-Bedingungen

HPLC-Bedingungen			
Vorsäule	ACE 3 C18 3 µm, 4 mm x 10 mm oder Äquivalent		
Analytische Säule	C18 ACE 3 AQ 3 µm, 3 mm x 150 mm oder Äquivalent		
Mobile Phase	Lösung A: 0,025 % TFA in Wasser (pH 2,6) Lösung B: Acetonitril Frisch am Tag des Einsatzes vorbereiten.		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	100	0
	0.5	100	0
	11	85	15
	19	75	25
	20	90	10
	26	100	0
	30	100	0
HPLC-Pumpe	Für mobile Phase		
Flussrate	0,25 ml pro Minute		
UV-Detektor / Wellenlänge	361 nm		
Säulenheizung	Hält die Vor- und die Analytische Säule bei 30 °C		
Integrator / Datenkontrollsystem	Von bevorzugtem Anbieter		
Injektor	Autosampler / Rheodyne-Ventil		
Injektionsvolumen	100 µl		

## Typisches HPLC-Chromatogramm von Babynahrung



## Typisches HPLC-Chromatogramm von Kuhmilch



## Qualität

RBR-Produkte werden unter einem ISO 9001- 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](http://www.r-biopharm.com)