



РОССИЙСКИЕ
ИННОВАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
КОНТРОЛЯ
БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ

www.dtsbiotech.com

ИММУНОАФФИННЫЕ
КОЛОНКИ
Afina - 015[®]

T-2 токсин

ИНСТРУКЦИЯ
по применению



Содержание

1. Материалы, необходимые для пробоподготовки	3
2. Меры предосторожности при выполнении пробоподготовки	3
3. Хранение	4
4. Срок годности	5
5. Чувствительность	5
6. Выход препарата	5
7. Отбор проб	5
8. Область применения	6
9. Выполнение испытаний	7
10. Приготовление стандартных растворов T-2 токсина	8
11. Хроматограммы для разных матриц	11
12. Библиография	12

1. Материалы, необходимые для пробоподготовки

- ✓ Лабораторные весы
- ✓ Стеклянная/пластиковая посуда
- ✓ Лабораторный блендер или шейкер
- ✓ Фильтровальная бумага/фильтровальный шприц
- ✓ Растворители для экстракции и вода (ВЭЖХ)
- ✓ Дистиллированная или деонизированная вода
- ✓ Пипетки и наконечники
- ✓ Сертифицированные стандарты Т-2 токсина
- ✓ Вытяжной шкаф
- ✓ Испаритель азотный
- ✓ Азот

2. Меры предосторожности при выполнении пробоподготовки

Т-2 токсин – высокотоксичное вещество.

Все работы, связанные с подготовкой пробы и приготовлением стандартных растворов следует проводить в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты: резиновые перчатки, очки, спецодежда. При работе с кристаллическим Т-2 токсином следует соблюдать особую предосторожность из-за сильных

электростатических свойств. При взвешивании кристаллов металлический шпатель следует заземлять. После проведения анализа рот, руки сполоснуть 1%-раствором гипохлорита натрия, а оборудование 5% раствором. Деконтаминацию стеклянной посуды, контактировавшей с токсинами, проводят 4% гипохлоритом натрия.

Приготовление раствора гипохлорита натрия: готовят растворы 10 гр. хлорной извести в 170 мл дист. воды и 7 гр. углекислого натрия в 170 мл воды. Второй раствор приливают к первому при непрерывном перемешивании. Полученную смесь фильтруют через бумажный фильтр и хранят в темном стекле. Из этого раствора путем разбавления готовят нужную концентрацию в дист. воде.

При приготовлении других растворов, применяемых в данной методике, используются также токсичные вещества и растворители. Поэтому процедуру приготовления растворов следует проводить в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты: резиновые перчатки, спецодежда.

3. Хранение



Колонки хранить при температуре 2-8°C.

Не замораживать



Убедиться, что сверху геля находится буфер.



Важно отметить, что антитела, включенные в иммуноаффинную колонку могут быть денатурированы экстремальной температурой или изменениями уровня pH.

4. Срок годности

Имуноаффинные колонки *Afina-015® T-2 токсин* стабильны в течение 18 месяцев от даты производства при выполнении условий хранения.

5. Чувствительность

Предел количественного обнаружения зависит от используемого аналитиком метода регистрации и при необходимости может быть повышен при простом увеличении объема экстракта, пропущенного через иммуноаффинную колонку.

6. Выход препарата

Для определения процента возврата аналита из исследуемой матрицы при процедуре пробоподготовки используются образцы, не содержащие *T-2 токсин*, в которые добавляется известное количество аналита.

7. Отбор проб

Представительная проба должна быть получена при соблюдении официально утвержденной процедуры отбора проб. С учетом неомогенности образца рекомендуется как минимум тщательно

размолоть 1 кг представительной пробы и взять для анализа часть пробы.

8. Область применения

T-2 токсин - трихотеценовый микотоксин, продуцируемый плесневым грибом рода фузариум, высоко токсичен для эукариотических организмов. Метод анализа основан на извлечении *T-2 токсина* из измельченной лабораторной пробы смесью органического растворителя с водой с последующей очисткой экстракта на иммуноаффинных колонках и дериватизацией до флуоресцирующего состояния, и далее определении концентрации *T-2 токсина* с помощью ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. Метод применим для определения *T-2 токсина* в зерновых, зернобобовых, семенах, продуктах их переработки, кормах и комбикормах и продуктах питания.

Имуноаффинная колонка *Afina-015 T-2 токсин* состоит из полипропиленового шприца емкостью 3 мл, в котором между двумя полипропиленовыми фильтрами (10-20 микрон) находится гель из сефарозы 4Б ковалентно пришитыми моноклональными антителами к *T-2 токсину*. При пропускании экстракта, содержащего *T-2 токсин* через колонку антитела захватывают *T-2 токсин*. Компоненты матрицы экстракта не связываются с антителами и хорошо удаляются при промывке.

Связанный микотоксин элюируется небольшой порцией метанола или ацетонитрила. Элюат

собирается в виалу для анализа. В качестве примера приведены хроматограммы для кукурузы и кукурузного глютенa. Иммуноаффинные колонки перед использованием должны находиться при комнатной температуре.

9. Выполнение испытаний

Экстракция

Поместить 25 г ± 0,1 г лабораторной пробы в коническую колбу вместимостью 250 мл. В колбу добавить 125 мл экстрагента – ацетонитрил/вода (75/25) (V/V).

Поставить колбу на аппарат для встряхивания и провести экстракцию в течении 1 часа либо используя высокоскоростной блендер проводить экстракцию в течение 5 минут.

Профильтровать полученный экстракт через бумажный фильтр «синяя лента» в стеклянную пробирку вместимостью не менее 25 мл.

Экстракт должен быть нейтральным (pH = 6-8). При необходимости pH экстракта довести 0,1 моль/литр раствором NaOH.

Разбавление экстракта

Пипеткой на 10 мл отобрать аликвоту фильтрата объемом 7 мл и перенести в коническую колбу на 100 мл. Оставшийся экстракт сохранять до конца анализа в холодильнике. В колбу добавить 28 мл дистиллированной воды. Перемешать вручную и отфильтровать 25 мл через бумажный фильтр «синяя лента» в мерный цилиндр вместимостью 25 мл.

Очистка экстракта



ВАЖНО! При работе на иммуноаффинных колонках не допускать пересыхания сорбента. Каждый последующий раствор должен наноситься на колонку, как только предыдущий достигнет верха сорбента.

Присоединить через адаптер шприц емкостью 10-15 мл к иммуноаффинной колонке и пропустить 25 мл разведенного экстракта со скоростью 1-3 мл/мин. При использовании манифолда скорость пропускания экстракта регулируется кранами манифолда.

После прохождения экстракта промыть колонку дистиллированной водой дважды со скоростью 5 мл/мин. Первыми 10 мл ополоснуть цилиндр, в котором был разведенный экстракт, и нанести на колонку; вторые 10 мл – чистая дистиллированная вода. Мягко вытолкнуть остатки воды шприцем, не давая высохнуть колонке. Для элюирования связанного T2 токсина используется метанол (HPLC grade) в количестве 3 мл., который пропускается через колонку несколькими малыми порциями (например, 3 раза по 1 мл.). Перед началом элюирования метанол задерживается в колонке на несколько секунд для полного контакта с гелем. После прохождения последней порции элюата мягко вытолкнуть остатки метанола из колонки в приёмную

ёмкость После окончания дериватизации образец готов для хроматографии. В случае низких концентраций Т2 токсина образец может быть высушен в токе азота и остаток растворён в 0,5 мл мобильной фазы. Выпарить досуха метанол, используя азотный испаритель и провести дериватизацию.

Для ВЭЖХ МС сухой остаток в колбе растворить в 1 мл подвижной фазы метанол/вода (8/2) (V/V) и перенести в вialку.

Дериватизация

К сухому остатку в колбу прилить 50 мкл диметиламиноперидина и 50 мкл 1-Антроилнитрила. Плотнo закрыть пробкой. Перемешать на вортексе 1 мин. Поместить колбу на водяную баню (50°C) на 15 мин, а затем поставить в лед на 10 мин. Выпарить содержимое колбы в токе азота на водяной бане при 50°C досуха. Охладить до комнатной температуры и растворить сухой остаток в 1 мл подвижной фазы ацетонитрил/вода (8/2) (V/V). Перенести в вialку. Анализировать методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. *Для увеличения срока службы колонок и предколонок ВЭЖХ рекомендуем фильтровать образец при помощи мембранного шприцевого фильтра 0,45 микрон.*

10. Приготовление стандартных растворов Т-2 токсина

I. Исходный стандартный раствор Т-2 токсина 100 мкг/мл в ацетонитриле:

10 мг кристаллического стандарта Т-2 токсина растворить в 100 мл ацетонитрила в мерной колбе на 100мл. Тщательно перемешать. Срок годности при температуре -18°C в морозильной камере -1 год.

II. Промежуточный стоковый стандартный раствор Т-2 токсина в концентрации 10 мкг/мл в ацетонитриле:

В мерную колбу на 10 мл налить 1 мл стандартного раствора 100 мкг/мл и довести до метки ацетонитрилом. Тщательно перемешать. Срок годности при температуре -18°C в морозильной камере -1 год.

III. Рабочий стандартный раствор Т-2 токсина 0,4 мкг/мл:

40 мкл стокового стандартного раствора в концентрации 10 мкг/мл выпарить в токе азота досуха и для ВЭЖХ с флуоресцентным детектором провести дериватизацию. Для ВЭЖХ МС растворить в 1 мл смеси метанол/вода (8/2) (V/V). Тщательно перемешать на вортексе. Рабочий раствор готовить в день проведения анализа.

11. Хроматограммы для разных матриц

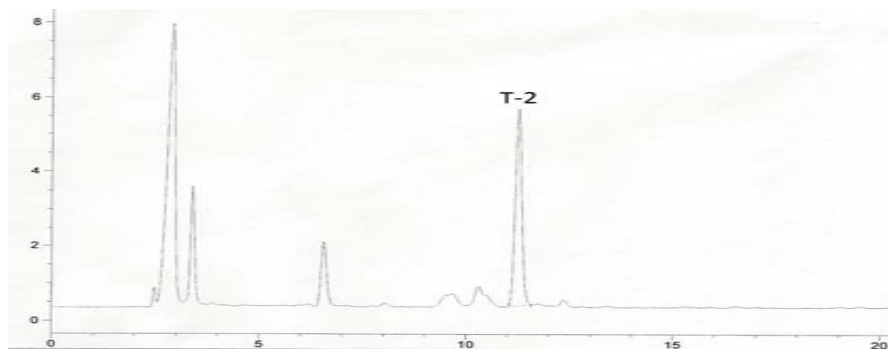


Рисунок. 1

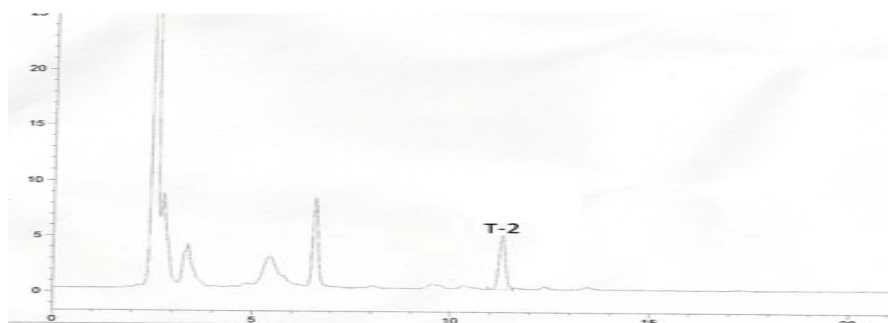


Рисунок. 2

Хроматограммы Т-2 токсина, демонстрирующие эффективность работы колонок «Afina 015 Т-2 токсин» в различных матрицах.

Рисунок 1 – кукуруза, содержащая Т-2 токсин 70,0 ppb после дериватизации.

Рисунок 2 – кукурузный глютен, содержащий Т-2 токсин 40,0 ppb после дериватизации.

ВЭЖХ Аджилент 1260, колонка Phenomenex Luna-2, C18, 250x4,6 мм, возбуждение 381 нм, эмиссия 470, предел детектирования 5,0 ppb.

12. Библиография

1	ГОСТ 28001-88	«Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона и охратоксина»
2	EASI-EXTRACT T-2 and HT-2	Immunoaffinity columns. P43/P43B R Biopharm Rhone LTD. Instructions for use.
3	NeoColumn T-2/HT-2	Immunoaffinity columns for the quantification of T-2/HT-2 In various commodities. User manual.

