



РОССИЙСКИЕ
ИННОВАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
КОНТРОЛЯ
БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ

www.dtsbiotech.com

ИММУНОАФФИННЫЕ
КОЛОНКИ
Afina - 015[®]

Зеараленон

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	5
9. Выполнение испытаний	6
10. Приготовление стандартных растворов зеараленона	9
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 зеараленона
- ✓ Вытяжной шкаф
- ✓ Испаритель азотный
- ✓ Азот

2. Меры предосторожности при выполнении пробоподготовки

Зеараленон – 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 зеараленоном 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 дистиллированной 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

Иммуноаффинные колонки **Afina-015®** **Зеараленон** 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 зеараленон, 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

Зеараленон – вторичный метаболит жизнедеятельности плесневых грибов, рода *Fusarium*. Обладает экстрогенными и анаболическими свойствами **Зеараленон** вызывает нарушения репродуктивной функции животных с клиническими признаками гиперэстрогенизма, наиболее выраженного у свиней.

Метод анализа основан на извлечении зеараленона из измельченной лабораторной пробы смесью органического растворителя с водой с последующей очисткой экстракта на иммуноаффинных колонках и определении концентрации зеараленон с помощью ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. Метод применим для определения зеараленона в зерновых, зернобобовых, семенах, продуктах их переработки, кормах и комбикормах и продуктах питания.

Иммуноаффинная колонка **Afina-015®** **Зеараленон** 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 зеараленону. При пропускании экстракта, содержащего зеараленон через колонку антитела захватывают зеараленон. 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 глютена. 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.

Жидкие образцы могут быть разбавлены PBS без предварительной экстракции. Содержание спирта в образце необходимо учитывать при вычислении разбавления. Спирт также может быть удалён путём испарения.

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 5 мл и перенести в коническую колбу на 100 мл. Оставшийся экстракт сохранять до конца анализа в холодильнике. В колбу добавить 25 мл PBS.

Перемешать вкруговую вручную и отфильтровать 24 мл через бумажный фильтр «синяя лента» в мерный цилиндр вместимостью 50 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 24 мл разведенного экстракта со скоростью 1-3 мл/мин. При использовании монофолда скорость пропускания экстракта регулируется кранами монофолда. Экстракт задержать в колонке несколько секунд перед началом пропускания. После прохождения экстракта промыть колонку PBS дважды со скоростью 5 мл/мин. Первыми 10 мл ополоснуть цилиндр, в котором был разведенный экстракт, и нанести на колонку; вторые 10 мл – чистый PBS. Мягко вытолкнуть остатки PBS шприцем, не давая высохнуть колонке. Для элюирования связанного зеараленона используется метанол (HPLC grade) в количестве 1,5-3 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. Образец готов для хроматографии. В случае низких концентраций зеараленона образец может быть высушен в токе азота и остаток растворён в 0,5 мл мобильной фазы ацетонитрил/2% уксусная кислота в соотношении 65/35 (V/V) и перенесён в вialку. Анализировать с помощью ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. Для увеличения срока службы колонок и предколонок ВЭЖХ рекомендуем фильтровать образец при помощи мембранного шприцевого фильтра 0,45 микрон.

Примечание: PBS-буфер (взвесить 8 г. NaCl; 1,2 г Na₂HPO₄; 0,2 г KH₂PO₄; 0,2 г KCl, растворить в 990 мл дистиллированной или деионизованной воды, отрегулировать pH до значения 7,0, используя NaOH или

НСI. Довести объём до 1000 мл дистиллированной или деионизованной водой).

10. Приготовление стандартных растворов зеараленона

I. Исходный стандартный раствор зеараленона 20 мкг/мл в смеси бензол/ледяная уксусная кислота 99/1 (V/V).

Растворить 2,0 мг кристаллического стандарта зеараленона в смеси бензол/ледяная уксусная кислота 99/1 (V/V) в мерной колбе на 100 мл.

Тщательно перемешать. Для установления точной концентрации стандартного раствора измеряют его оптическую плотность при длине волны 333 нм (D_{333}) в кювете на 1 см.

Концентрацию раствора вычисляют по формуле:

$$C = \frac{D_{316} \times 1000 \times 318,0}{6060 \times 1} \text{ мкг/мл}$$

Хранить при температуре -18°C в морозильной камере 1 год.

II. Промежуточный стандартный раствор зеараленона

В мерную колбу на 10 мл налить 250 мкл стандартного раствора 20 мкг/мл и довести до метки смесью бензол/ледяная уксусная кислота 99/1 (V/V). Тщательно перемешать.

Хранить при температуре -18°C в морозильной камере 6 мес.

III. Рабочий стандартный раствор зеараленона 1,0 мкг/мл (p-pB)

Выпарить 100 мкл стандартного раствора в концентрации 10 мг/мл в токе азота досуха и растворить в 1,0 мл мобильной фазы (ацетонитрил/вода 70/30) (V/V).

Тщательно перемешать на вортексе.

Рабочий раствор готовить в день проведения анализа.

11. Хроматограммы для разных матриц

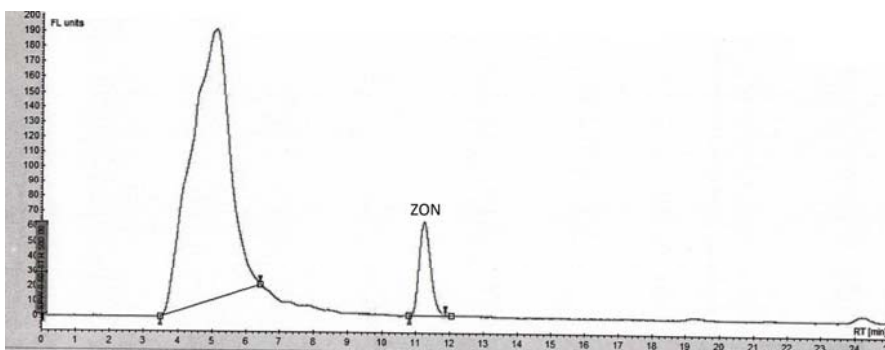


Рисунок. 1

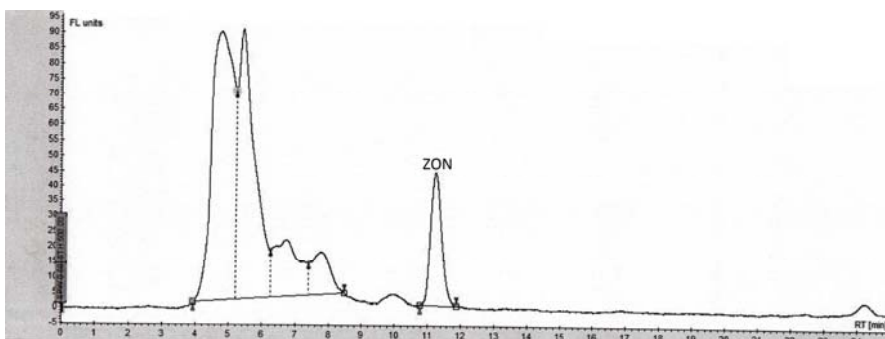


Рисунок. 2

Хроматограммы, демонстрирующие эффективность работы колонок «Afina 015 Зеараленон» в различных матрицах.

Рисунок 1 – кукуруза, содержащая Зеараленон -252 ppb.

Рисунок 2 – кукурузный глютен, содержащий Зеараленон-176 ppb.
ВЭЖХ Varian 920LC, колонка Phenomenex Luna-2, C18, 250x4,6 мм, возбуждение 274 нм, эмиссия 440, предел детектирования 5,0 ppb.

12. Библиография

1	ГОСТ 31691-2012	«Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение содержания зеараленона методом ВЭЖХ»
2	ГОСТ EN 15850-2013	«Продукты пищевые. Определение зеараленона в продуктах детского питания на кукурузной основе, ячменной, кукурузной и пшеничной муке, поленте и продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинных колонок»
3	DIN EN 15792-2009	«Корма для животных. Определение зеараленона в кормах для животных. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с очисткой на иммуноаффинных колонках».

