



РОССИЙСКИЕ  
ИННОВАЦИОННЫЕ  
ТЕХНОЛОГИИ  
КОНТРОЛЯ  
БЕЗОПАСНОСТИ  
ПИЩЕВОЙ  
ПРОДУКЦИИ

[www.dtsbiotech.com](http://www.dtsbiotech.com)

ИММУНОАФФИННЫЕ  
КОЛОНКИ  
**Afina - 015<sup>®</sup>**

*Охратоксин А*

**ИНСТРУКЦИЯ**  
по применению



## Содержание

1. Материалы, необходимые для пробоподготовки .....	3
2. Меры предосторожности при выполнении пробоподготовки.....	3
3. Хранение .....	5
4. Срок годности .....	5
5. Чувствительность.....	5
6. Выход препарата .....	5
7. Отбор проб.....	6
8. Область применения.....	6
9. Выполнение испытаний.....	7
10. Приготовление стандартных растворов охратоксина А .....	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 деионизированная вода
- ✓ Пипетки и наконечники
- ✓ Сертифицированные стандарты охратоксина
- ✓ Вытяжной шкаф
- ✓ Испаритель азотный
- ✓ Азот

## 2. Меры предосторожности при выполнении пробоподготовки

Охратоксин А – 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 охратоксином А 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

Имуноаффинные колонки *Afina-015*® *Охратоксин А* 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 охратоксин, 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

*Охратоксин А* – токсичный метаболит, вырабатываемый грибами рода *Aspergillus* и *Penicillium*. *Охратоксин А* является хорошо известным канцерогеном и нефротоксичен для животных и людей.

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

Имуноаффинная колонка *Afina-015*® *Охратоксин А* 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 охратоксину А. При пропускании экстракта, содержащего охратоксин, через колонку антитела захватывают охратоксин. 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, кукурузного глютена и корма для птицы. Иммуноаффинные колонки перед использованием должны находиться при комнатной температуре.

## 9. Выполнение испытаний

### Экстракция

Для твёрдых образцов взвесить 25 г ± 0,1 г лабораторной пробы в коническую колбу вместимостью 250 мл. В колбу добавить 100 мл экстрагента - метанол-вода 60/40 (V/V) или смесь ацетонитрил-вода 60/40 (V/V). Поставить колбу на аппарат для встряхивания и провести экстракцию в течение 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

Экстракт разбавляется PBS до содержания ацетонитрила не более 5% (V/V). В случае использования метанольного экстракта, содержание метанола не должно превышать 20% (V/V). Пипеткой на 10 мл отобрать аликвоту фильтрата объемом 4 мл и перенести в

коническую колбу на 100 мл. Оставшийся экстракт сохранять до конца анализа в холодильнике. В колбу добавить 48 мл PBS.

Перемешать вручную и отфильтровать 25 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 45 мл разведенного экстракта со скоростью 2 мл/мин.

При использовании манифолда скорость пропускания экстракта регулируется кранами манифолда. 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 охратоксина А используется смесь 98/2 метанол(HPLC grade)/ледяная уксусная кислота (V/V) в количестве 1,5-3 мл., которая пропускается через колонку несколькими малыми порциями (например, 3 раза по 1 мл.). Перед началом элюирования смесь метанола и уксусной кислоты задерживается в колонке на несколько секунд

для полного контакта с гелем. После прохождения последней порции элюата мягко вытолкнуть остатки смеси метанола и уксусной кислоты из колонки в приёмную ёмкость. В случае низкой концентрации охратоксина образец может быть высушен в токе азота и остаток растворён в 0,5 мл мобильной фазы. Выпарить досуха метанол, используя азотный испаритель.

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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 г KCl, растворить в 990 мл дистиллированной или деионизованной воды, отрегулировать pH до значения 7,0, используя NaOH или HCl. Довести объём до 1000 мл дистиллированной или деионизованной водой).

## 10. Приготовление стандартных растворов охратоксина А

### I. Исходный стандартный раствор охратоксина 20 мкг/мл в смеси бензол/ледяная уксусная кислота 99/1 (V/V). (раствор «А»)

Растворить 2,0 мг кристаллического стандарта охратоксина 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<sub>333</sub>) в кювете на 1 см.

Концентрацию раствора вычисляют по формуле:

$$C = \frac{D_{333} \times 1000 \times 403,8}{5550 \times 1} \text{ мкг/мл}$$

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

### II. Промежуточный стандартный раствор охратоксина А 0,5 мкг/мл в смеси бензол/ледяная уксусная кислота 99/1 (V/V). (раствор «В»)

В мерную колбу на 10 мл налить 0,25 мл стандартного раствора «А» 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 охратоксина А 0,05 мкг/мл

Выпарить 100 мкл стандартного раствора «В» в токе азота досуха и растворить в 1,0 мл подвижной фазы (ацетонитрил/2% уксусная кислота)

Тщательно перемешать на вортексе.

Рабочий раствор готовить в день проведения анализа.

## 11. Хроматограммы для разных матриц

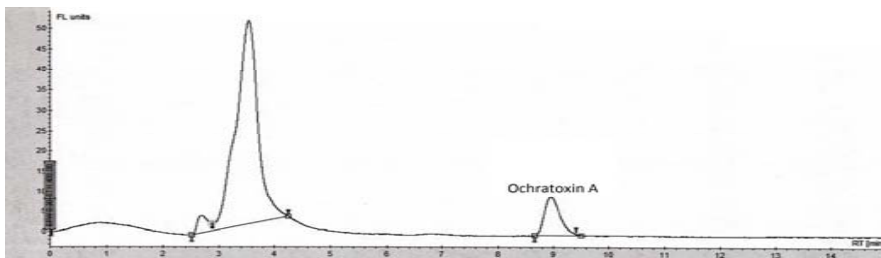


Рисунок. 1

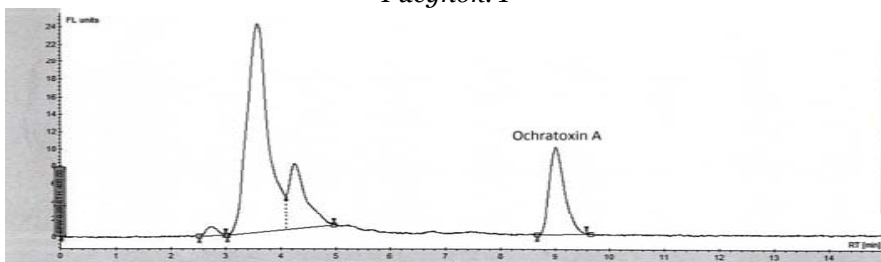


Рисунок. 2

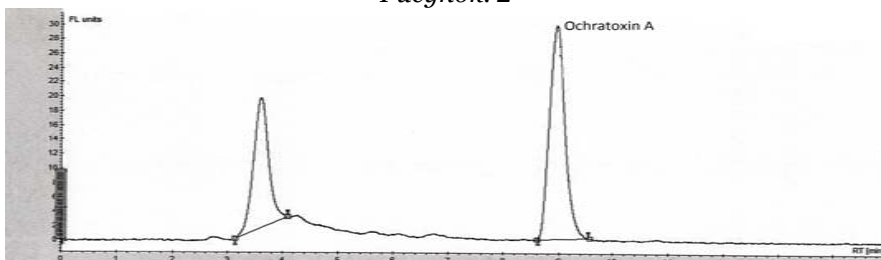


Рисунок. 3

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

Рисунок 1 – кукуруза, содержащая Охратоксин А -5,48 ppb.

Рисунок 2 – кукурузный глютен, содержащий Охратоксин А -6,64 ppb.

Рисунок 3 – корм для птицы, содержащий Охратоксин А -18,10 ppb.

ВЭЖХ Varian 920LC, колонка Phenomenex Luna-2, C18, 250x4,6 мм, возбуждение 332 нм, эмиссия 460, предел детектирования 0,1 ppb.

## 12. Библиография

1	ГОСТ EN	14132-2013 с 01.07.2015	Определение охратоксина А в ячмене и жареном кофе. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта.
2	ГОСТ EN	15835-2013 с 01.07.2015	Продукты пищевые. Определение охратоксина А в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрического детектирования.
3	ГОСТ EN	15829-2011	Продукты пищевые. Определение охратоксина А в коринке, изюме, кишмише, смесях сушеных фруктов и инжире сушеном. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и детектирования по флуоресценции.

