



РОССИЙСКИЕ
ИННОВАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
КОНТРОЛЯ
БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ

www.dtsbiotech.com

ИММУНОАФФИННЫЕ
КОЛОНКИ
Afina - 015[®]

**Афлатоксины
B1, B2, G1, G2
+Охратоксин А**

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 Афлатоксинов B1, B2, G1, G2 и Охратоксина А	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
- ✓ Дистиллированная или деонизированная вода
- ✓ Пипетки и наконечники
- ✓ Сертифицированные стандарты Афлатоксинов В1, В2, G1, G2 и Охратоксина А
- ✓ Вытяжной шкаф
- ✓ Испаритель азотный
- ✓ Азот

2. Меры предосторожности при выполнении пробоподготовки

Микотоксины – высокотоксичные вещества. 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 кристаллическими стандартами микотоксинов 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 дистиллированной 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*[®] *Afla+Ochra* 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 Афлатоксин **V1, V2, G1, G2** и Охратоксин **A**, 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

Метод анализа основан на извлечении **Афлатоксинов V1, V2, G1, G2** и **Охратоксина A** из измельченной лабораторной пробы смесью органического растворителя с водой с последующей очисткой экстракта на иммуноаффинных колонках и определении концентрации **Афлатоксинов V1, V2, G1, G2** и **Охратоксина A** с помощью ВЭЖХ с флуоресцентным детектором после процедуры дериватизации. Метод применим для определения **Афлатоксинов V1, V2,**

G1, G2 и **Охратоксина A** в зерновых, зернобобовых, орехах, продуктах их переработки, кормах и комбикормах. При использовании ВЭЖХ с масс-селективным детектором дериватизация **Афлатоксинов V1, V2, G1, G2** не требуется.

Иммуноаффинная колонка *Afina-015*[®] *Afla+Ochra* состоит из полипропиленового шприца емкостью 3 мл, в котором между двумя полипропиленовыми фильтрами (10-20 микрон) находится гель из сефарозы 4Б с ковалентно пришитыми моноклональными антителами к **Афлатоксину V1, V2, G1, G2** и **Охратоксину A**. При пропускании экстракта, содержащего **Афлатоксин V1, V2, G1, G2** и **Охратоксин A** через колонку антитела захватывают **Афлатоксин V1, V2, G1, G2** и **Охратоксин A**. Компоненты матрицы экстракта не связываются с антителами и хорошо удаляются при промывке.

Связанный микотоксин элюируется небольшой порцией метанола или ацетонитрила. Иммуноаффинные колонки перед использованием должны находиться при комнатной температуре.

9. Выполнение испытаний

Экстракция

Для твердых 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 удален путём испарения. Профильтровать полученный экстракт через бумажный фильтр «синяя лента» в стеклянную пробирку вместимостью не менее 25 мл.

Экстракт должен быть нейтральным (рН = 6-8). При необходимости рН 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 8 мл и перенести в коническую колбу на 100 мл. Оставшийся экстракт сохранять до конца анализа в холодильнике. В колбу добавить 24 мл PBS.

Перемешать вкруговую 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 25 мл разведенного экстракта со скоростью 1-2 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 ёмкость, в которой был разведенный экстракт, и нанести на колонку; вторые 10 мл – чистый PBS.

Мягко вытолкнуть остатки PBS шприцем, не давая высохнуть колонке. Для элюирования связанных Афлатоксинов В1, В2, G1, G2 и Охратоксина А 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. После окончания дериватизации образец готов для хроматографии. В случае низких концентраций Афлатоксинов В1, В2, G1, G2 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.

Процедура дериватизации Афлатоксинов В1, В2, G1, G2

К сухому остатку добавить 100 мкл трифторуксусной кислоты, плотно закрыть колбу, оставить на 30 мин. при комнатной температуре. Затем добавить 400 мкл раствора ацетонитрил/вода (30/70) (V/V). Тщательно перемешать. Полученный раствор перенести в виалку и определить Афлатоксины В1, В2, G1, G2 методом ВЭЖХ с детектором по флуоресценции. 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 рН до значения 7,0, используя NaOH или HCl. Довести объём до 1000 мл дистиллированной или деионизованной водой).

10. Приготовление стандартных растворов Афлатоксинов В1, В2, G1, G2 и Охратоксина А

I. Исходный стандартный раствор АТВ1, АТВ2, АТG1, АТG2 10 мкг/мл в смеси бензол/ацетонитрил 98/2 (V/V).

Растворить по 1,0 мг каждого кристаллического стандарта АТ отдельно в смеси бензол/ацетонитрил 98/2 (V/V) в мерной колбе на 100 мл.

Тщательно перемешать. Для установления точной концентрации каждого стандартного раствора измеряют его оптическую плотность при длине волны (Д) соответственно АТВ1-353 нм, АТВ2-355 нм, АТГ1 – 355 нм и АТГ2 – 355 нм в кювете на 1 см (1).

Концентрацию раствора вычисляют по формуле:

$$C = \frac{D \times 1000 \times M.B.}{E \times 1} \quad \text{мкг/мл}$$

где – *M.B.* – молекулярный вес соответственно АТВ1-312,3, АТВ2-314, АТГ1 – 328 и АТГ2-330;

E – молярная экстинкция соответственно АТВ1-19800, АТВ2-20900, АТГ – 17100 и АТГ2 – 18200;

Стандартные растворы хранить при температуре -18°C в морозильной камере 1 год.

II. Промежуточный стоковый стандартный раствор АТВ1, АТВ2, АТГ1, АТГ2 0,2 мкг/мл в смеси бензол/ацетонитрил 98/2 (V/V).

В мерную колбу на 10 мл налить 200 мкл каждого стандартного раствора 10 мкг/мл и довести до метки смесью бензол/ацетонитрил 98/2 (V/V). Тщательно перемешать.

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

III. Рабочий стоковый стандартный раствор АТВ1, АТВ2, АТГ1, АТГ2 0,02 мкг/мл.

Выпарить 100 мкл стандартного раствора 0,02 мкг/мл в токе азота досуха и провести дериватизацию, растворить в подвижной фазе вода/ацетонитрил 70/30 (V/V).

Тщательно перемешать на вортексе.

Рабочий раствор готовить в день проведения анализа.

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_{333}) в кювете на 1 см.

Концентрацию раствора вычисляют по формуле:

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

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

II. Промежуточный стандартный раствор охратоксина 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 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

12. Библиография

1	ГОСТ EN	15851-2013	Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрическим детектированием.
2	ГОСТ	31748-2012	Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 и общего содержания афлатоксинов В1, В2, G1, G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.
3	ГОСТ EN	14132-2013 с 01.07.2015	Определение охратоксина А в ячмене и жареном кофе. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта.
4	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.
5	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 флюоресценции.