



РОССИЙСКИЕ
ИННОВАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
КОНТРОЛЯ
БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ

www.dtsbiotech.com

ИММУНОАФФИННЫЕ
КОЛОНКИ
Afina - 015[®]

Афлатоксин М1

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.....	6
7. Отбор проб.....	6
8. Область применения	6
9. Выполнение испытаний	7
10. Приготовление стандартных растворов афлатоксина М1	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
- ✓ Дистиллированная или деонизированная вода
- ✓ Пипетки и наконечники
- ✓ Сертифицированные стандарты афлатоксина М1
- ✓ Вытяжной шкаф
- ✓ Испаритель азотный
- ✓ Азот

2. Меры предосторожности при выполнении пробоподготовки

Афлатоксины – 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. 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.

Иммуноаффинная колонка содержит азид натрия.

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*® *Афлатоксин М1* 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 М1, в которые добавляется известное количество аналита.

7. Отбор проб

Представительная проба должна быть получена при соблюдении официально утвержденной процедуры отбора проб.

8. Область применения

Афлатоксины B1, B2, G1, G2 – высокотоксичные канцерогенные вторичные метаболиты жизнедеятельности плесневых грибов рода *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*.

При употреблении дойными коровами кормов, загрязнённых афлатоксинами *B1, B2, G1, G2*, в молоке содержится афлатоксин М1 - метаболит афлатоксинов. В виду более высокой токсичности афлатоксина М1 допустимый уровень содержания афлатоксина М1 в молочных продуктах не должен превышать 0,5 мкг/кг и 0,05 мкг/кг в продуктах для детского питания.

Метод анализа основан на извлечении афлатоксина М1 из натурального или сухого молока, а также из гомогенизированных твёрдых молочных продуктов (масло, сыр, творог) смесью органического растворителя с водой с последующей очисткой экстракта на иммуноаффинных колонках и определении концентрации

афлатоксина М1 с помощью ВЭЖХ с флуоресцентным детектором.

Иммуноаффинная колонка **Afina-015®** **Афлатоксин М1** 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 М1. При пропускании экстракта, содержащего афлатоксин М1 через колонку, антитела захватывают афлатоксин М1. Компоненты матрицы экстракта не связываются с антителами и хорошо удаляются при промывке.

Связанный микотоксин элюируется небольшой порцией метанола или ацетонитрила. В качестве примера приведены хроматограммы демонстрирующие эффективность работы колонки **Afina-015®** **Афлатоксин М1**.

Иммуноаффинные колонки перед использованием должны находиться при комнатной температуре.

9. Выполнение испытаний

Экстракция

1. Молоко натуральное и сухое:

Пропустить через колонку 50 мл тёплого (30-35С°) натурального или растворённого сухого молока, предварительно отфильтрованного на бумажном фильтре «синяя лента» со скоростью 1-3 мл/мин

2. Твёрдые молочные продукты:

Взвесить 25 г ± 0,1 г лабораторной пробы в коническую колбу вместимостью 250 мл или ёмкость блендера. В случае масла расплавить образец и добавить 15 г целлита.

В колбу добавить 100 мл экстрагента – метанол/вода 80/20 (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. Профильтровать полученный экстракт через бумажный фильтр «синяя лента» или стеклянный фильтр.

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

Разбавление экстракта

В 10 мл экстракта добавить 40 мл деионизованной воды. Оставшийся экстракт сохранять до конца анализа в холодильнике.

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 50 мл разведенного экстракта со скоростью 1-2 мл/мин. При использовании манифолда скорость пропускания экстракта регулируется кранами манифолда.

Экстракт задержать в колонке несколько секунд перед началом пропускания. После прохождения экстракта промыть колонку деионизованной водой дважды со скоростью 5 мл/мин. Первыми 10 мл ополоснуть ёмкость, в которой был разведенный экстракт, и нанести на колонку; вторые 10 мл – деионизованная вода.

Мягко вытолкнуть остатки деионизованной воды шприцем, не давая высохнуть колонке. Для элюирования связанного афлатоксина М1 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 афлатоксина М1 образец может быть высушен в токе азота и остаток растворён в 0,5 мл мобильной фазы.

10. Приготовление стандартных растворов афлатоксина М1

I. Исходный стандартный раствор афлатоксина М1 0,5 мкг/мл в ацетонитриле фирмы «BIOPURE» (раствор А)

II. Промежуточный стандартный раствор афлатоксина М1 0,05 мкг/мл в ацетонитриле (раствор В).

1,0 мл стандартного раствора афлатоксина М1 (раствор А) довести до метки ацетонитрилом в мерной колбе на 10 мл.

Тщательно перемешать на вортексе.

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

III. Рабочий стандартный раствор афлатоксина М1 0,005 мкг/мл.

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

Тщательно перемешать на вортексе.

Рабочий раствор готовить в день проведения анализа.

IV. Подвижная фаза – смесь растворителя с водой для того, чтобы растворить высушенную пробу перед хроматографом (вода/ацетонитрил 70/30 (V/V).

Тщательно перемешать.

Готовить не ранее, чем за 1 час до проведения анализа.

Хранить при комнатной температуре 1 неделю.

11. Хроматограммы для разных матриц

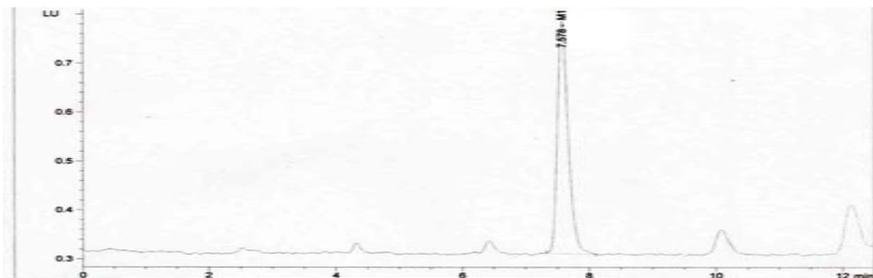


Рисунок. 1

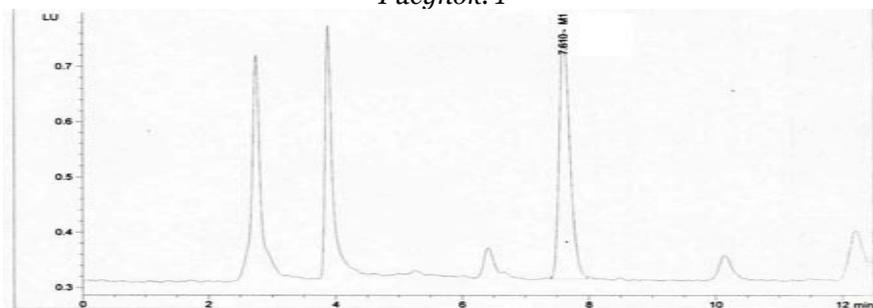


Рисунок. 2

Хроматограммы, демонстрирующие эффективность работы колонок «Afina 015 Афлатоксин М1».

Рисунок 1 – Хроматограмма стандартного раствора Афлатоксина М1, пропущенного через иммуноаффинную колонку. Концентрация 5 нг/мл.

ВЭЖХ Аджилент 1260 с флуоресцентным детектором, колонка Phenomenex Luna-2, C18 250x4,6 мм, возбуждение 360 нм, эмиссия 440 нм.

Рисунок 2 – Молоко сухое обезжиренное. Концентрация афлатоксина М1 0,48 мкг/л.

ВЭЖХ Аджилент 1260 с флуоресцентным детектором, колонка Phenomenex Luna-2, C18 250x4,6 мм, возбуждение 360 нм, эмиссия 440 нм. Выход добавки 93%.

12. Библиография

1	ГОСТ 31709-2012	Определение содержания афлатоксинов М1. Очистка с помощью иммуноаффинной хроматографии.
2	ГОСТ 31711-2001	Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В1 и М1.
3		Aflastar™ M1 R – Immunoaffiniti Columns. Isem COIAC 1005 for the purification of Aflatoxin M1 in conjunction with HPLC ROMER LABS.

