



РОССИЙСКИЕ  
ИННОВАЦИОННЫЕ  
ТЕХНОЛОГИИ  
КОНТРОЛЯ  
БЕЗОПАСНОСТИ  
ПИЩЕВОЙ  
ПРОДУКЦИИ

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

**Афлатоксины  
B1, B2, G1, G2**

**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 .....	7
10. Приготовление стандартных растворов афлатоксина B1, B2, G1, G2 .....	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 афлатоксинов B1, B2, G1, G2
- ✓ 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. При работе с кристаллическими афлатоксинами B1, B2, G1, G2 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*<sup>®</sup> **Афлатоксин В1, В2, G1, G2** 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 В1, В2, G1, G2, 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

*Афлатоксины В1, В2, G1, G2 (AT)* – высокотоксичные канцерогенные вторичные метаболиты жизнедеятельности плесневых грибов рода *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*.

Метод анализа основан на извлечении афлатоксинов В1, В2, G1, G2 из измельченной лабораторной пробы смесью органического растворителя с водой с последующей очисткой экстракта на иммуноаффинных колонках и определении концентрации афлатоксинов В1, В2, G1, G2 с помощью ВЭЖХ с флуоресцентным детектором после процедуры дериватизации. Метод применим для определения афлатоксинов В1, В2, G1, G2 в зерновых, зернобобовых, орехах, продуктах их переработки, кормах и комбикормах.

Иммуноаффинная колонка *Afina-015*<sup>®</sup> **Афлатоксин В1, В2, G1, G2** 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 В1, В2, G1, G2. При пропускании экстракта, содержащего афлатоксин В1, В2, G1, G2 через колонку антитела захватывают афлатоксин В1, В2, G1, G2. 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 для кукурузы, кукурузного глютена и арахисовой пасты. 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 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 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 манифолда скорость пропускания экстракта регулируется кранами манифолда.

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 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 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**

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 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 афлатоксина В1, В2, G1, G2**

**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, АТG1 – 355 нм и АТG2 – 355 нм в кювете на 1 см (1).

Концентрацию раствора вычисляют по формуле:

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

где – M.V. – молекулярный вес соответственно АТВ1-312,3, АТВ2-314, АТG1 – 328 и АТG2-330;

E – молярная экстинкция соответственно АТВ1-19800, АТВ2-20900, АТG – 17100 и АТG2 – 18200;

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

**II. Промежуточный стоковый стандартный раствор АТВ1, АТВ2, АТG1, АТG2 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, АТG1, АТG2 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.

## 11. Хроматограммы для разных матриц

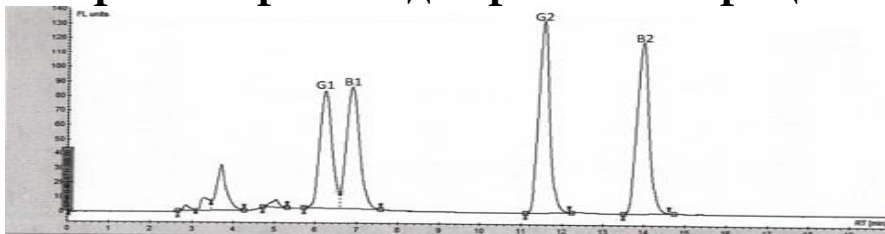


Рисунок. 1

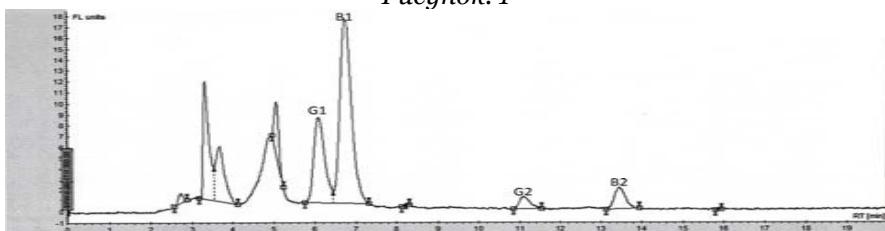


Рисунок. 2

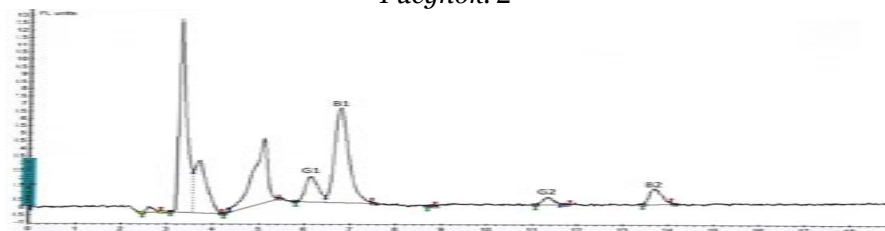


Рисунок.3

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

Рисунок 1 – кукуруза, содержащая Афлатоксины: B1-5,03 ppb, B2-5,50 ppb, G1- 4,95 ppb, G2-5,55 ppb.

Рисунок 2 – кукурузный глютен, содержащий Афлатоксины: B1-6,72 ppb, B2-13,44 ppb, G1-6,07 ppb, G2-11,08 ppb.

Рисунок 3 – арахисовая паста, содержащая Афлатоксины: B1-4,40 ppb, B2-0,50 ppb, G1-1,20 ppb, G2-<0,2 ppb.

ВЭЖХ Varian 920LC, колонка Phenomenex Luna-2, C18 250x4,6 мм, возбуждение 366 нм, эмиссия 460, предколоночная дериватизация ТФУК, предел детектирования 0,1 ppb.

## 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.

