



РОССИЙСКИЕ
ИННОВАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
КОНТРОЛЯ
БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ

www.dtsbiotech.com

ИММУНОАФФИННЫЕ
КОЛОНКИ
Afina - 015[®]

**Фумонизины
В1, В2**

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 фумонизина В1, В2	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 фумонизина
- ✓ Вытяжной шкаф
- ✓ Испаритель азотный
- ✓ Азот

2. Меры предосторожности при выполнении пробоподготовки

Фумонизины – 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 фумонизинами 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®** **Фумонизины В1, В2** 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 фумонизины В1, В2, 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

Фумонизины В1, В2 (ФВ1, ФВ2) – группа микотоксинов, выделяемых в процессе жизнедеятельности плесневыми грибами рода *Fusarium*, главным образом *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, которые

поражают в основном кукурузу. Существует множество видов фумонизинов, но чаще всего встречаются фумонизины В1, В2. Наиболее токсичен из них фумонизин В1.

Метод анализа основан на извлечении фумонизинов В1, В2 из измельченной лабораторной пробы смесью органического растворителя с водой с последующей очисткой экстракта на иммуноаффинных колонках и определении концентрации фумонизинов В1, В2 с помощью ВЭЖХ с флуоресцентным детектором после процедуры дериватизации.

Метод применим для определения фумонизинов В1, В2 в зерновых, зернобобовых, семенах, продуктах их переработки, кормах и комбикормах и продуктах питания.

Иммуноаффинная колонка **Afina-015®** **Фумонизины В1, В2** 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 фумонизину В1, В2. При пропускании экстракта, содержащего фумонизин В1, В2 через колонку антитела захватывают фумонизины В1, В2. 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 стандарта Фумонизинов В1, В2 и кукурузы. Иммуноаффинные колонки перед использованием должны находиться при комнатной температуре.

9. Выполнение испытаний

Экстракция

Поместить 20 г ± 0,1 г лабораторной пробы в коническую колбу вместимостью 250 мл. В колбу добавить 100 мл экстрагента – метанол/ацетонитрил/вода в соотношении 25/25/50 (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. 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

Пипеткой на 10 мл отобрать аликвоту фильтрата объемом 10 мл и перенести в коническую колбу на 100 мл.

Оставшийся экстракт сохранять до конца анализа в холодильнике. В колбу добавить 40 мл PBS. Перемешать в круговую вручную и отфильтровать 10 мл через бумажный фильтр «синяя лента» в мерный цилиндр вместимостью 25 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 10 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. Не выталкивать остатки PBS шприцем, не давая высохнуть колонке. Для элюирования связанного фузонина используется смесь 98/2 метанол(HPLC grade)/ледяная уксусная кислота (V/V) в количестве 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 приемную ёмкость.

Выпарить досуха элюат на азотном испарителе и провести дериватизацию.

Процедура дериватизации

К сухому остатку добавить 1 мл метанола, 1 мл боратного буфера, 0,5 мл цианида натрия и 0,5 мл НДА, плотно закрыть колбу пробкой, перемешать на вортексе в течение 1 мин. Поместить колбу на водяную баню (60 °C) оставить на 25 мин. при комнатной температуре. Охладить и добавить смесь ацетонитрил в фосфатный буфер в соотношении 30:20. Перемешать на вортексе в течение 1 минуты. Перенести в виалу, анализировать методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. Для увеличения срока службы колонок и предколонок ВЭЖХ

рекомендуем фильтровать образец при помощи мембранного шприцевого фильтра 0,45 микрон.

10. Приготовление стандартных растворов фумонизина В1, В2

I. Исходный стандартный раствор ФВ1 100 мкг/мл в растворе ацетонитрил/вода 1/1 (V/V) (раствор А).

1 мг кристаллического стандарта ФВ1 и довести до метки в мерной колбе на 10 мл смесью ацетонитрил/вода 1/1 (V/V).

Срок хранения 1 год, температура хранения ниже 0°C.

II. Исходный стандартный раствор ФВ2 100 мкг/мл в растворе ацетонитрил/вода 1/1 (V/V) (раствор В).

1 мг кристаллического стандарта ФВ2 растворить и довести до метки в мерной колбе на 10 мл смесью ацетонитрил/вода 1/1 (V/V).

Срок хранения 1 год, температура хранения ниже 0°C.

III. Промежуточный стоковый стандартный раствор ФВ1 (25 мкг/мл) и ФВ2 (10 мкг/мл) в смеси ацетонитрил/вода 1/1 (V/V). (раствор С).

В мерную колбу на 10 мл налить 2,5 мл стандартного раствора А и 1 мл стандартного раствора В и довести до метки раствором ацетонитрил/вода 1/1 (V/V).

Срок хранения 6 месяцев, температура хранения ниже 0°C.

IV. Рабочий стоковый стандартный раствор ФВ1 (0,25 мкг/мл) и ФВ2 (0,1 мкг/мл) (раствор D).

100 мкл раствора С выпарить в токе азота досуха в остродонной колбе на 25 мл и провести дериватизацию.

Рабочий раствор готовить в день проведения анализа.

V. Боратный буфер 0,05 М.

1,91 г тетрабората натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$) растворить в воде и довести в мерной колбе на 100 мл до метки. рН 9,5 (доводить 20% NaOH).

Хранить при температуре 4-8°C.

VI. PBS-буфер (взвесить 8 г. NaCl; 1,2 г Na_2HPO_4 ; 0,2 г KH_2PO_4 ; 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).

VII. НДА – нафталин 2,3 дикарбоксальдегид. Раствор в метаноле.

25 мг НДА растворить в метаноле и довести в мерной колбе на 100 мл до метки метанолом.

Хранить 1 неделю при температуре 4-8°C.

VIII. Натрий цианистый в дистиллированной воде.

13 мг NaCN растворить в воде и довести в мерной колбе на 100 мл до метки водой.

Хранить 1 месяц при температуре 4-8°C.

IX. Раствор для экстракции (экстрагент) метанол/ацетонитрил/ дистиллированная вода 25/25/50 (V/V).

К 25 объемным частям метанола добавить 25 объемных частей ацетонитрила и 50 объемных частей дистиллированной воды (например: 250 мл метанола, 250 мл ацетонитрила и 500 мл воды). Тщательно перемешать. Раствор готовить не менее, чем за час до процедуры экстракции.

11. Хроматограммы для разных матриц

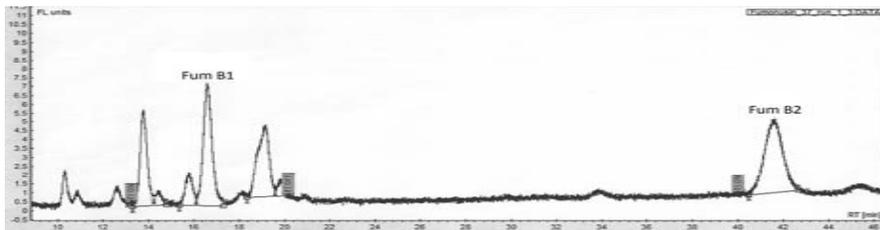


Рисунок. 1

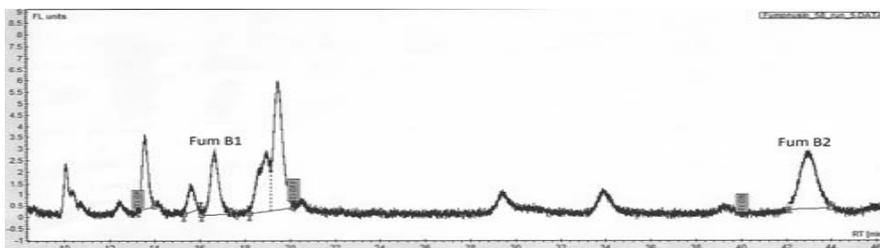


Рисунок. 2

Хроматограммы, демонстрирующие эффективность работы колонок «Afina 015 Фумонизины В1.В2» в различных матрицах.

Рисунок. 1 Раствор стандарта Фумонизинов В1, В2 после очистки и дериватизации.

Рисунок. 2 Кукуруза, содержащая Фумонизин В1 1000 ppb, Фумонизин В2 1000 ppb

ВЭЖХ Varian 920LC, колонка Phenomenex Luna-2, C18 250x4,6 мм, возбуждение 420 нм, эмиссия 500, предколоночная дериватизация, предел детектирования 5,0 ppb.

12. Библиография

1	ГОСТ EN	13585-2013 с 01.07.2015	Продукты пищевые. Определение фумонизинов В1 и В2 в кукурузе. Метод ВЭЖХ с применением очистки экстракта методом твердофазной экстракции.
2	ГОСТ EN	14352-2013 с 01.07.2015	Продукты пищевые. Определение фумонизинов В1 и В2 в продуктах на основе кукурузы. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта.

