

AFLAOCHRA PREP®

Арт. No. P89/P89B

Иммуноаффинные колонки для использования вместе
с ВЭЖХ или ЖХ-МС/МС

Только для использования *in vitro*

P89V15/27.05.22



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор
в России:**

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54



AFLAOCHRA PREP®

Принцип работы

Процедура основана на технологии моноклональных антител, что делает тест высокоспецифичным, чувствительным, быстрым и простым в выполнении. Колонки содержат гелевую суспензию моноклональных антител, специфичных к токсинам. После экстракции токсинов экстракт образца фильтруют, разбавляют и медленно пропускают через иммуноаффинную колонку. Любые токсины, присутствующие в образце, задерживаются антителами. Колонку промывают для удаления несвязанного материала, а затем токсины выводятся из колонки после элюирования растворителем. Элюат собирают и анализируют ВЭЖХ или ВЭЖХ-МС. Афлатоксины необходимо дериватизировать перед анализом. Общее время экстракции и очистки занимает около 20 минут. Результат – высокая чистота и концентрация токсинов, экстрагированных из матриц, что дает более четкую хроматограмму и, следовательно, обеспечивает более точную и чувствительную детекцию токсина в продукте. При большом количестве образцов работу с колонками можно автоматизировать.

Необходимые, но не предоставленные реагенты

- Дистиллированная/деионизированная вода (вода пригодная для использования в HPLC, например MilliQ).
- Растворители (метанол для ВЭЖХ).
- Фосфатный буфер (PBS) (RP202)*.
- Стандарты микотоксинов (см. раздел «Подготовка стандартов»).
- Хлорид натрия.
- Натрия гидроксид (для регулировки pH фильтрата, если требуется).
- Азотная кислота (требуется только при дериватизации с помощью KOBRA® CELL).
- Бромид калия (требуется только при дериватизации с помощью KOBRA® CELL).

Вспомогательные материалы

- Фильтровальная бумага Whatman № 113 или № 4.
- Фильтровальная бумага из стекловолокна
- KOBRA® CELL (K01)*.
- Штатив для иммуноаффинных колонок (CR1)*.
- Набор принадлежностей для иммуноаффинных колонок (AP01)*.

*продукты доступные в R-Biopharm. Пожалуйста, для получения дополнительной информации и приобретения свяжитесь с местным дистрибьютером.

Меры предосторожности

Микотоксины являются очень опасными веществами. Только лаборатории, оснащенные для работы с токсическими веществами и растворителями, должны проводить анализ на микотоксины. Соответствующая защитная одежда, включающая перчатки, защитные очки и лабораторные накидки должна использоваться в ходе проведения анализа. Работы должны выполняться в вытяжном шкафу с использованием защитного экрана. Огнеопасные растворители должны храниться в специальной комнате, при соблюдении правил хранения огне- и взрывоопасных веществ.

Для получения дополнительной информации и Листов безопасности (MSDS) свяжитесь с местным дистрибьютером R-Biopharm.

Рекомендуемые методы и примечания по применению

Методы доступны для всех матриц, подпадающих под действие законодательства, а также для дополнительных товаров. Отклонение от методов, описанных в нашей инструкции по применению, может не привести к оптимальным результатам. Пожалуйста, свяжитесь с вашим местным дистрибьютором R-Biopharm для получения дополнительной информации.

Деконтаминация

Перед утилизацией, оставшиеся после анализа стандартные растворы, должны быть обработаны 5% гипохлоритом натрия, минимальное соотношение стандартного раствора и 5% гипохлорита натрия 10:1. Лабораторное оборудование и загрязненные отходы должны быть погружены в 5% раствор гипохлорита натрия на 30 мин и затем в 5% ацетон на 30 мин, далее загрязненные предметы необходимо обильно сполоснуть водой. После деконтаминации лабораторное оборудование необходимо тщательно вымыть. Отходы, при наличии соответствующего разрешения, сожгите.

Условия и сроки хранения

Срок годности колонок составляет 18 месяцев с даты изготовления, если они хранятся при температуре 2–8 ° C, или 12 месяцев с даты изготовления, если они хранятся при температуре 21–25 ° C. Не замораживать. Убедитесь, что колонка не высохла и содержит буфер над гелем. Важно отметить, что антитела могут денатурироваться в результате экстремального изменения температуры или pH.

Образцы

Представленные образцы должны быть получены в ходе официально установленной процедуры. Рекомендуется, как минимум 1 кг представленного

образца измельчить и отобрать порцию (10-50 г в зависимости от используемого метода) для экстракции.

Чувствительность

Чувствительность зависит от системы обнаружения, используемой аналитиком. Однако чувствительность теста можно улучшить, увеличив объем образца, пропущенного через иммуноаффинную колонку. Обратите внимание, что важно поддерживать установленное соотношение растворителя и фосфатно-солевого буфера (PBS).

Степень извлечения материала

Если необходимо учесть потери при проведении экстракции токсинов из определенного образца, рекомендуется в качестве референс стандарта использовать, контаминированный спайк-раствором, заведомо чистый аналогичный образец. Степень извлечения, обнаруженная в ходе анализа контаминированного референс образца, может быть использована при корректировке результатов анализа неизвестных образцов.

Подготовка колонки

Перед использованием иммуноаффинные колонки следует прогреть при температуре окружающей среды. Наличие промежутка между гелем и фриттой является нормальным явлением. Иногда во время транспортировки здесь может образоваться пузырь. В этом случае пузырек можно удалить, постучав основанием колонки по твердой поверхности. Снимите колпачок с верхней части колонки, отрежьте запечатанный конец и замените. Надежно прикрепите колонку к стеклянному цилиндру шприца и поместите в штатив для иммуноаффинной колонки или зажимную стойку.

Элюция

Чтобы полностью элюировать токсин / токсины из иммуноаффинной колонки, жизненно важно, чтобы растворитель контактировал с антителами в гелевой суспензии в течение достаточного периода времени. Это гарантирует, что все связи между антителом и токсином будут разорваны, что в конечном итоге приведет к высвобождению всего присутствующего токсина, готового для инъекции в выбранную систему обнаружения. Чтобы обеспечить контакт растворителя с гелем антител в течение достаточного периода времени, можно использовать несколько методов:

Обратная промывка (этот метод рекомендует R-biopharm): обратная промывка путем осторожного подъема и опускания поршня шприца во время прохождения растворителя через колонку. Этот процесс изменит направление потока элюата на обратное. Это следует повторить 3 раза.

Небольшие объемы растворителя: нанесите объем растворителя, необходимый для элюирования, в виде двух-четырёх меньших аликвот. Позвольте каждой аликвоте находиться в гелевой суспензии не менее 30 секунд, прежде чем дать возможность полностью пройти через гелевую суспензию. Все аликвоты собирают в один флакон, готовый для инъекции.

Инкубация с растворителем: нанесите полный объем растворителя, необходимый для элюирования, на иммуноаффинную колонку, позвольте 2-3 каплям пройти через колонку, закройте нижнюю крышку и дайте растворителю отстояться в гелевой суспензии в течение минимум 60 секунд, прежде чем дать возможность полностью пройти через гелевую суспензию.



Пробоподготовка

- **зерновые**

Этот метод был испытан на ряде злаков и псевдозлаков, включая пшеницу, ячмень, кукурузу, лебеду, просо, полбу и булгур.

1. Взвесьте 25 г измельченного образца и 5 г хлорида натрия в 1-литровую, устойчивую к растворителям чашу блендера.

2. Добавьте 100 мл 80 % метанола и перемешивайте на высокой скорости в течение 2 минут.

3. Отфильтруйте образец через фильтровальную бумагу Whatman № 113 или № 4 или отцентрифугируйте при 4000 об/мин в течение 10 минут.

4. Разбавьте 4 мл фильтрата 36 мл фосфатно-солевого буфера (PBS).

5. Отфильтруйте разбавленный экстракт через фильтровальную бумагу из стекловолокна.

6. **ВЭЖХ:** пропускают 10 мл фильтрата (эквивалентно 0,25 г образца).

ЖХ-МС/МС: пропускают 20 мл разбавленного фильтрата (эквивалентно 0,5 г образца).

Фильтрат должен проходить через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (или образец может проходить через колонку под действием силы тяжести, если это предпочтительнее). Медленная, постоянная скорость потока необходима для захвата токсинов антителами.

7. **ВЭЖХ:** Промойте колонку 20 мл PBS.

ЖХ-МС/МС: Промойте колонку 20 мл воды.

Колонку следует промывать со скоростью примерно 5 мл в минуту. Пропустите воздух через колонку, чтобы удалить остаточную жидкость.

8. Элюировать токсины из колонки со скоростью потока 1 капля в секунду, используя 1 мл 100 % метанола, и собрать в пробирку из темного стекла.

Пожалуйста, обратитесь к разделу «Элюция» для дополнительной информации.

9. После элюирования пропустите через колонку 1 мл воды и соберите ее в тот же флакон, чтобы получить общий объем 2 мл.

10. **ВЭЖХ:** введите 100 мкл в систему ВЭЖХ.

ЖХ-МС/МС: введите 25 мкл в систему ЖХ-МС/МС.

- **Специи и сухофрукты**

Этот метод был протестирован на ряде специй, включая паприку и черный перец, а также на сухофруктах, включая сальтану, изюм, инжир и абрикосы.

Примечание. Для масляной смолы паприки и куркумы есть дополнительная инструкция, которая доступна по запросу.

1. Взвесьте 25 г измельченного образца и 5 г хлорида натрия в 1-литровую, устойчивую к растворителям чашу блендера.

2. Добавьте 100 мл 80 % метанола и перемешивайте на высокой скорости в течение 2 минут.

3. Отфильтруйте образец через фильтровальную бумагу Whatman № 113 или № 4 или отцентрифугируйте при 4000 об/мин в течение 10 минут.

4. Разбавьте 4 мл фильтрата 36 мл 10 % Tween 20 в фосфатно-солевом буфере (PBS).

5. Отрегулируйте pH примерно до 7,4, используя 2 М раствор гидроксида натрия.

6. Отфильтруйте разбавленный экстракт через фильтровальную бумагу из стекловолокна.

7. Пропустите 10 мл фильтрата (эквивалентно 0,25 г пробы) через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (или, если предпочтительнее, проба может пройти через колонку под действием силы тяжести). Медленная, постоянная скорость потока необходима для захвата токсинов антителами.

8. **ВЭЖХ:** Промойте колонку 20 мл PBS.

ЖХ-МС/МС: Промойте колонку 20 мл воды.

Колонку следует промывать со скоростью примерно 5 мл в минуту. Пропустите воздух через колонку, чтобы удалить остаточную жидкость.

9. Элюировать токсины из колонки со скоростью потока 1 капля в секунду, используя 1 мл 100 % метанола, и собрать в пробирку из темного стекла. Пожалуйста, обратитесь к разделу «Элюция» для дополнительной информации.

10. После элюирования пропустите через колонку 1 мл воды и соберите ее в тот же флакон, чтобы получить общий объем 2 мл.

11. **ВЭЖХ:** введите 100 мкл в систему ВЭЖХ.

ЖХ-МС/МС: введите 25 мкл в систему ЖХ-МС/МС.

Подготовка стандартов

• Исходный стандартный раствор афлатоксина

Рекомендуется начинать с раствора общего афлатоксина с концентрацией 1000 нг/мл.

Примечание. Соотношение В1, В2, G1 и G2 может различаться в каждом стандарте. Обратите внимание на правильное соотношение для приобретенного стандарта.

• Исходный стандартный раствор охратоксина

Рекомендуется начинать с раствора охратоксина А с концентрацией 1000 нг/мл.

• Комбинированный рабочий стандарт

1. Отмерьте 2,5 мл 100% метанола в темную пробирку.
2. Удалите 160 мкл в отходы.
3. Добавьте 100 мкл стандарта общего афлатоксина 1000 нг/мл и 60 мкл стандарта охратоксина 1000 нг/мл.
4. Добавьте 2,5 мл воды, чтобы получить комбинированный раствор 20 нг/мл общего афлатоксина и 12 нг/мл охратоксина.

Калибровочная кривая

Рекомендуется провести как минимум калибровочную кривую по 3–6 точкам. При построении подходящей кривой уровни калибровочных стандартов должны охватывать или включать диапазон ожидаемых результатов. Разведенные стандартные растворы следует приготовить свежими в день проведения анализа и использовать в течение 24 часов.

Пример того, как подготовить калибровочную кривую по четырем точкам (может быть изменена в соответствии с законодательными требованиями или уровнями загрязнения):

1. Стандарт 4: Возьмите 250 мкл комбинированного рабочего стандарта и доведите до 2 мл 50 % метанола (эквивалентно 2,5 нг/мл общего афлатоксина и 1,5 нг/мл охратоксина А).

2. Стандарт 3: Возьмите 1 мл Стандарта 4 и добавьте 1 мл 50 % метанола (эквивалентно 1,25 нг/мл общего афлатоксина и 0,75 нг/мл охратоксина А).

3. Стандарт 2: Возьмите 1 мл Стандарта 3 и добавьте 1 мл 50 % метанола (эквивалентно 0,625 нг/мл общего афлатоксина и 0,375 нг/мл охратоксина А).

4. Стандарт 1: Возьмите 800 мкл Стандарта 2 и доведите до 2 мл 50 % метанола (эквивалентно 0,25 нг/мл общего афлатоксина и 0,15 нг/мл охратоксина А).

5. **ВЭЖХ:** Введите 100 мкл каждого раствора в систему ВЭЖХ.

Порядок элюирования общего количества афлатоксинов следующий: G2, G1, В2, В1 и охратоксина А при дериватизации с помощью КОBRA® CELL.

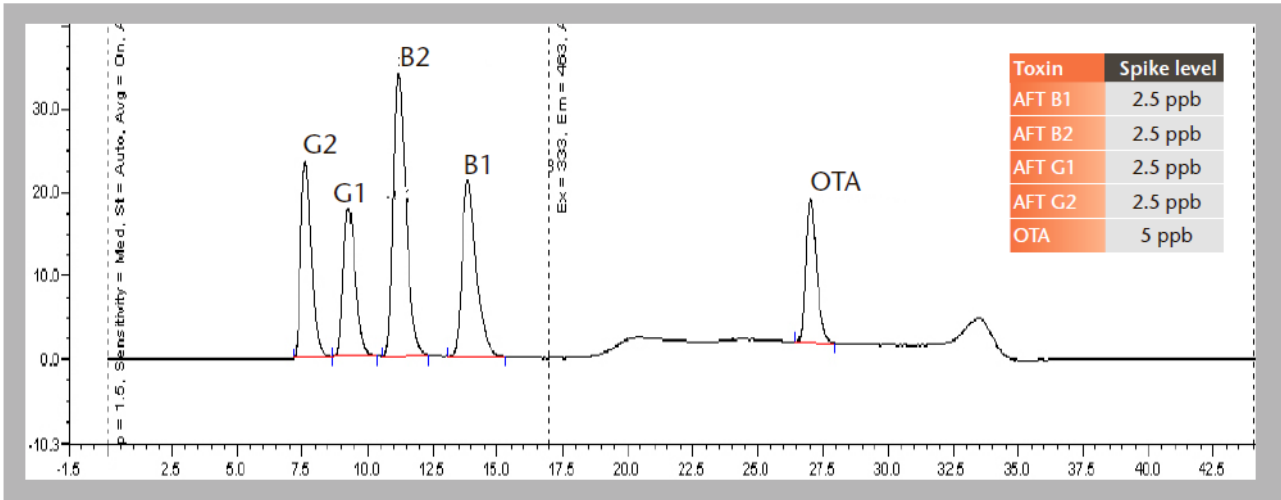
ЖХ-МС/МС: введите 25 мкл каждого раствора в систему ЖХ-МС/МС.

Рекомендуемые условия ВЭЖХ

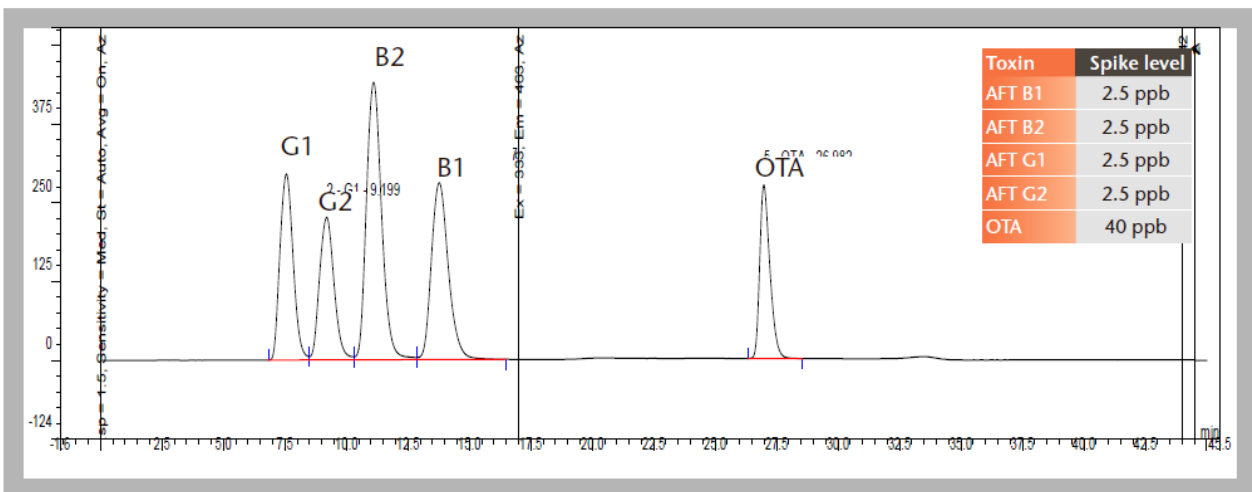
Условия ВЭЖХ			
Дериватизация	КОBRA® CELL, 100 мкл		
Защитный картридж (Guard Cartridge)	Inertsil ODS-3 5 мкм, 4 mm x 10 mm (Hichrom) или эквивалент		
Аналитическая колонка	Inertsil ODS-3V 5 мкм, 4.6 mm x 150 mm (Hichrom) или эквивалент		
Подвижная фаза	Раствор А: вода:метанол (55:45 v/v). Раствор В: вода:метанол (20:80 v/v). Добавьте 119 мг бромида калия и 350 мкл 4 М азотной кислоты к 1 литру подвижной фазы А и В. Раствор готовить свежий в день анализа.		
Градиент	Время, мин	% Раствор А	% Раствор В
	0	100	0
	14	100	0
	16	35	65
	30	35	65
	31	100	0
	40	100	0
Насос HPLC	Для доставки мобильной фазы		
Скорость потока	0,8 мл/мин		
Флуоресцентный детектор	Время, мин	Возбуждение	Испускание
	0	365 нм	442 нм
	17	333 нм	463 нм
Нагреватель колонки	Поддерживающий картридж (maintain guard) и аналитическую колонку до 40°C		
Интегратор/Система управления данных	По предпочтению потребителя		
Инжектор	Автосамплер/клапан Rheodyne		
Вводимый объем	100 мкл		
Порядок элюции	Афлатоксины G2, G1, В2, В1 и охратоксин А		

Пример ВЭЖХ хроматограммы:

- Кукуруза



- Паприка



Рекомендуемые условия ЖХ-МС/МС

Условия ЖХ

Аналитическая колонка	Phenomenex Gemini 5 μ m C18 110 A, 150 mm x 3 mm or equivalent		
Подвижная фаза	Раствор А: 1 мМ формиата аммония и 0,1 % муравьиной кислоты в воде: метаноле (95: 5) Раствор В: 1 мМ формиат аммония и 0,1 % муравьиная кислота в воде: метаноле (2:98). Приготовьте свежий раствор в день проведения анализа.		
Градиент	Время, мин	% Раствор А	% Раствор В
	0	80	20
	0,1	80	20
	10	10	90
	15	10	90
	15,1	80	20
20	80	20	
Насос HPLC	Для доставки подвижной фазы		
Скорость потока	0,3 мл/мин		
Нагрев колонки	Поддерживайте аналитическую колонку при температуре 40°C		
Нагреватель колонки	Поддерживающий картридж (maintain guard) и аналитическую колонку до 40°C		
Интегратор/Система управления данными	По предпочтению потребителя		
Инжектор	Автосамплер/ Реодиновый клапан		
Вводимый объем	50 мкл		

Условия МС

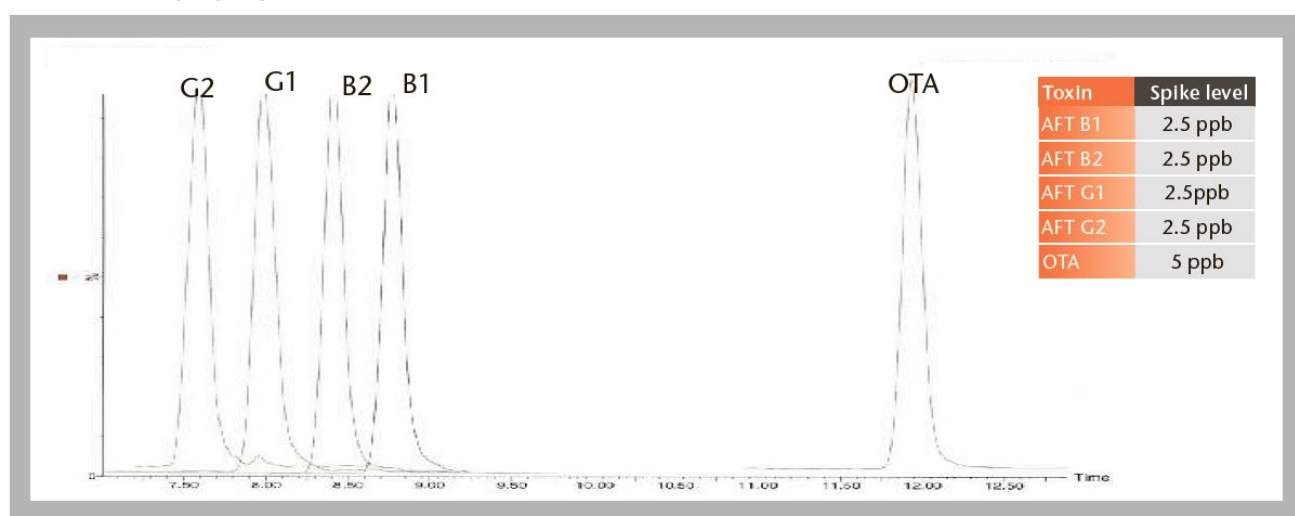
Прибор	Детектор Waters® ACQUITY TQ с электроспреем
Режим	Режим мониторинга множественных реакций (MRM) с положительной полярностью
Капиллярное напряжение	+0,64 КВ
Исходная температура	150 °С
Температура газа десольватации	350 °С
Скорость потока газа десольватации	80 л/час (N)
Скорость потока конусного газа	50 л/час (N)

Настройки прибора

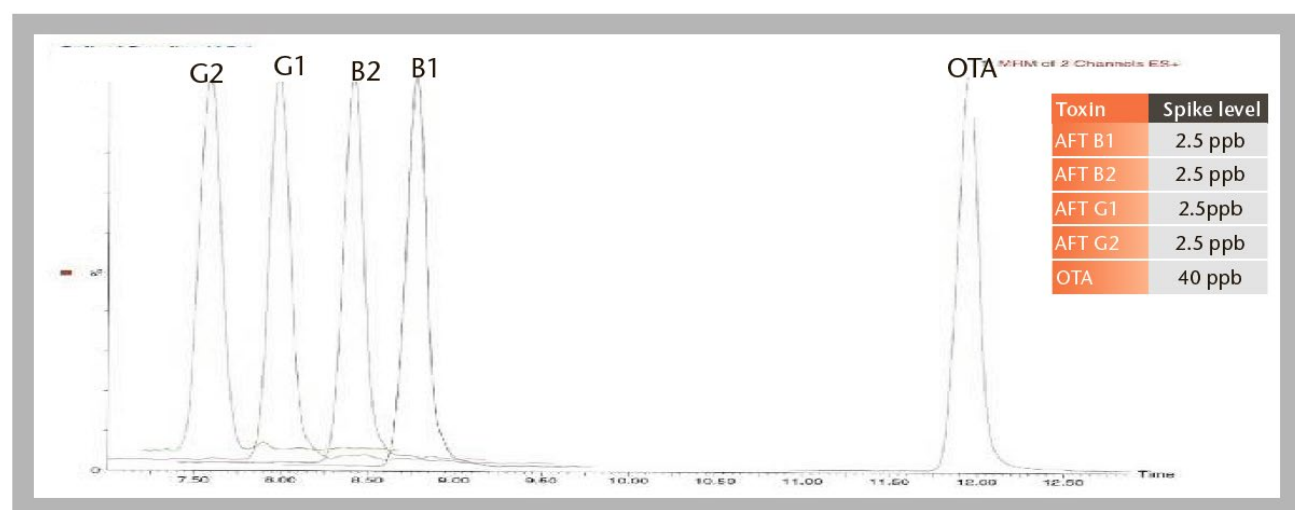
Токсин	RT (мин)	Ион прекурсор (m/z)	Исслед. ион (m/z)	Время пребывания (с)	Напряжение конуса (В)	Напряжение столкновения (эВ)
AFT G2	7,81	330.9 [M+H] ⁺	245,13 (квантификатор) 189,07 (квалификатор)	0,102	54 54	32 42
AFT G1	8,21	328.9 [M+H] ⁺	243,06 (квантификатор) 199,88 (квалификатор)	0,102	52 52	28 42
AFT B2	8,66	314.9 [M+H] ⁺	281,12 (квантификатор) 259,15 (квалификатор)	0,102	58 58	26 30
AFT B1	9,02	312.9 [M+H] ⁺	284,93 (квантификатор) 241,10 (квалификатор)	0,102	50 50	22 36
OTA	12,03	403.9 [M+H] ⁺	239,0 (квантификатор) 358,1 (квалификатор)	0,428	32 32	22 14

Пример хроматограммы ЖХ-МС/МС

- Кукуруза



- Паприка



Качество

Продукты R-Biopharm разработаны, произведены, протестированы и отправлены в соответствии с системой управления качеством ISO 9001, гарантирующей постоянство качества изделия. Наши изделия использовались во многих исследованиях, лежащих в основе разработки европейских и международных стандартных методов, и широко используются ключевыми институтами, пищевыми компаниями и правительственными лабораториями. Отзывы потребителей изделий R-Biopharm доступны по запросу.

Техническая поддержка

R-Biopharm понимает, что время от времени, пользователи нашей продукции могут нуждаться в помощи или совете. Следовательно, мы с удовольствием предлагаем следующие сервисы для наших пользователей.

1. Анализ проблем с образцами.
2. Практические рекомендации по работе со сложными образцами.
3. Доступ к библиотеке R-Biopharm.
4. Инсталляция и поддержка KOBRA®CELL.
5. Советы по параметрам детекции.
6. Советы по приготовлению стандартов.
7. Информирование об изменениях в законодательстве, пробоподготовке или других новостях по e-mail.
8. Обеспечение спайкованными образцами.

**Официальный дистрибьютор
в России:
ООО "НеоТест"**

Техническая поддержка
support@neo-test.ru
+7 499 704 05 50

**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:
ОДО "КомПродСервис"**

Техническая поддержка
support@komprod.com
+375 17 336 50 54

Гарантия

R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что все изделия произведены R-Biopharm. Материалы, из которых произведена продукция, соответствующего качества. Дефектные продукты будут заменены. Потребитель берет на себя все риски и ответственность за использование изделий и процедур предлагаемых R-Biopharm. R-Biopharm не несет ответственности за любой ущерб, включая специальный или косвенный ущерб, или расходы, возникающие непосредственно или косвенно от использования продукта и процедур R-Biopharm.