# DONPREP®

## Арт. No. P50 / P50B

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

Только для использования *in vitro*

P50/V18/27.05.22

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

# DONPREP®

**Принцип работы**

Процедура основана на технологии моноклональных антител, которые обеспечивают высокую специфичность, чувствительность, скорость и простоту выполнения процедуры.

Колонки содержат гелевую суспензию моноклональных антител, специфичных к интересующему токсину. После выделения токсина экстракт образца фильтруется, разбавляется и медленно пропускается через иммуноаффинную колонку. Любой токсин, присутствующий в образце, удерживается антителом в гелевой суспензии.

Общее время извлечения и очистки занимает около 20 минут. В результате улучшается очистка и концентрация токсина в образцах продуктов питания и кормов, что дает гораздо более чистую хроматограмму и, следовательно, обеспечивает более точное и чувствительное обнаружение. Колонки также имеют дополнительное преимущество в том, что они могут быть автоматизированы для крупномасштабного анализа образцов.

**Необходимые, но не предоставленные реагенты**

- дистиллированная/деионизированная вода (пригодная для использования в ВЭЖХ, например MilliQ);
- растворители (метанол и ацетонитрил для ВЭЖХ);
- стандарт дезоксиниваленола (см. раздел "Подготовка стандартов");
- гидроксид натрия;
- хлорид натрия.

**Вспомогательные материалы**

- Whatman № 113 или фильтровальная бумага № 4;
- Фильтровальная бумага из микрофибры (стекловолокна);
- стойка для иммуноаффинных колонок (CR1*);
- набор аксессуаров для иммуноаффинных колонок (AP01*);

* – продукты доступны 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.

Методы доступны для всех матриц, охватываемых законодательством, а также для дополнительных товаров. За дополнительной информацией обращайтесь к местному дистрибьютору R-Biopharm.

**Методы использования и рекомендации**

Методы, изложенные в инструкции, применимы для широкого спектра образцов. Пожалуйста, для получения дополнительной информации свяжитесь с местным дистрибьютером.

**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**

Колонки могут использоваться на протяжении 18 месяцев с даты их производства, если хранятся при 2 – 8°C или 12 месяцев с даты их производства, если хранятся при 21 – 25°C. Колонки нельзя замораживать.

Убедитесь, что колонка в процессе хранения не высохла и содержит буфер над гелем. Важно заметить, что антитела, входящие в состав колонки могут быть денатурированы, если колонка подвергалась воздействию экстремальных температур или pH.

**Образцы**

Представленные образцы должны быть получены в ходе официально установленной процедуры. Рекомендуется измельчить как минимум 1 кг представленного образца и далее отбирать порции (10 – 50 г в зависимости от используемого метода) для проведения анализа.

**Чувствительность**

Чувствительность метода зависит от чувствительности оборудования, на котором выполняется анализ. Тем не менее, чувствительность теста может быть улучшена, если увеличить объем образца пропускаемого через иммуноаффинную колонку.

**Степень извлечения материала**

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

**Подготовка колонки**

Перед использованием температуру иммуноаффинной колонки необходимо довести до температуры окружающей среды. Удалите крышку с верхней части колонки. Надежно прикрепите колонку к цилиндру стеклянного шприца и поместите в подставку или стойку для иммуноаффинных колонок.

**Элюция**

Для полного выведения токсина/ов из иммуноаффинной колонки необходимо, чтобы растворитель находился в контакте с антителом в гелевой суспензии в течение достаточного периода времени. Это гарантирует, что все связи между антителом и токсином будут разорваны, в конечном итоге высвобождая весь токсин из колонки для анализа с помощью выбранной системы детекции.

Для обеспечения контакта растворителя с гелем антител в течение достаточного периода времени можно использовать любой из следующих методов элюирования: -

**Обратная промывка** (это предпочтительный метод, используемый в компании R-Biopharm): обратная промывка путем осторожного поднятия и опускания поршня шприца во время прохождения растворителя через колонку. Этот процесс изменит направление потока элюата через гель. Эту процедуру следует повторить 3 раза перед сбором элюата. Перейдите к следующему шагу метода.

**Использование малого количества растворителя:** используйте объем растворителя, необходимый для элюции,

разделенным на 2 – 3 аликвоты. Каждая аликвота растворителя должна контактировать с гелевой суспензией не менее 30 секунд.

**Инкубация с растворителем:** используйте весь объем растворителя необходимый для элюции, позвольте 2 – 3 каплям растворителя пройти через колонку. Оставшийся растворитель должен находиться в колонке как минимум 60 секунд.

**Пробоподготовка**

- **Зерновые**

Метод был протестирован на большом количестве зерновых продуктов, включая пшеницу, ячмень, маис и продукты на основе зерновых.

1. Взвесьте 25 г измельченного образца и 5 г хлорида натрия в устойчивом к растворителям емкости блендера емкостью 1 л.
2. Добавьте 200 мл воды, перемешайте в течение 2 мин на большой скорости.
3. Профильтруйте образец через Whatman № 113 или фильтровальную бумагу № 4 или центрифугируйте при 4000 об/мин в течение 10 мин.
4. Снова профильтруйте через фильтровальную бумагу из микрофибры.
5. Пропустите 2 мл фильтрата, эквивалентного 0,25 г образца, через колонку при скорости потока 2 мл/мин (также можно позволить фильтрату двигаться через колонку за счет действия силы тяжести). Медленный, стабильный поток фильтрата необходим для захвата токсина антителами.
6. Промойте колонку, пропуская через нее 20 мл воды при скорости потока 5 мл/мин. Пропустите через колонку воздух для удаления остатков жидкости.
7. Элюируйте токсин из колонки при скорости потока 1 капля/сек, используя 1,5 мл 100%-ого метанола и соберите в стеклянную пробирку Дополнительную информацию см. в разделе "Элюирование".
8. Выпаривайте элюат до сухости на воздухе при температуре 60 – 70 °C.
9. Восстановите 1 мл 15 % метанола. Смешивайте на вортексе в течение 20 сек.
10. Введите 100 мкл восстановленного элюата в систему ВЭЖХ.

- **Корм для животных**

1. Взвесьте 25 г измельченного образца и 5 г хлорида натрия в устойчивом к растворителям емкости блендера емкостью 1 л.
2. Добавьте 200 мл воды, перемешайте в течение 2 мин на большой скорости.
3. Центрифугируйте при 4000 об/мин в течение 10 мин.
4. Доведите pH до 7.4 с помощью 2 М гидроксида натрия.

5. Профильтруйте через фильтровальную бумагу из микрофибры.

6. Если анализ проводится при уровне 6 000 ppb или ниже, пропустите 2 мл фильтрата (эквивалентно 0,25 г образца) через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (также можно позволить фильтрату двигаться через колонку за счет действия силы тяжести). Медленный, стабильный поток фильтрата необходим для захвата токсина антителами.

или

Если анализ проводится на уровне более 6 000 ppb, разбавьте 2 мл фильтрата 2 мл воды.

Пропустите 2 мл разбавленного фильтрата (эквивалентно 0,125 г образца) через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (также можно позволить фильтрату двигаться через колонку за счет действия силы тяжести). Медленный, стабильный поток фильтрата необходим для захвата токсина антителами.

7. Промойте колонку, пропуская через нее 10 мл воды при скорости потока 5 мл/мин. Пропустите через колонку воздух для удаления остатков жидкости.

8. Элюируйте токсин из колонки при скорости потока 1 капля/сек, используя 1,5 мл 100%-ого метанола и соберите в стеклянную пробирку. Рекомендуется обратная промывка. Дополнительную информацию см. в разделе "Элюирование".

9. Выпаривайте элюат до сухости на воздухе при температуре 60 – 70 °C.

10. Восстановите 1 мл 15 % метанола. Смешивайте на вортексе в течение 20 сек.

11. Введите 100 мкл восстановленного элюата в систему ВЭЖХ.

**Пиво**

1. Дегазируйте образец под вакуумом или в звуковой ванне в течение 30-60 минут. Если образец был открыт и оставлен на ночь перед дегазацией, это сокращает необходимое время.

2. Возьмите приблизительно 30 мл образца и отрегулируйте его до pH 7,4 с помощью 2 М гидроксида натрия.

3. Пропустите 20 мл образца через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (или образец можно пропустить через колонку под действием силы тяжести, если это предпочтительнее). Медленная, устойчивая скорость потока необходима для захвата токсина антителом.

4. Промойте колонку, пропустив через нее 10 мл фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) при скорости потока приблизительно 5 мл в минуту. Пропустите через колонку воздух для удаления остатков жидкости.

5. Элюируйте токсин из колонки при скорости потока 1 капля в секунду с помощью 1,5 мл 100% метанола и соберите в стеклянную пробирку. Для получения дополнительной информации см. раздел "Элюирование" в инструкции по применению.

6. После элюирования пропустите через колонку 8,5 мл воды и соберите в ту же пробирку, чтобы получить общий объем 10 мл.

7. Введите 100 мкл в систему ВЭЖХ.

**Детское питание**

1. Взвесьте 25 г измельченного образца и 8 г полиэтиленгликоля (ПЭГ) в устойчивом к растворителям блендере емкостью 1 л.

2. Добавьте 200 мл воды и смешивайте на высокой скорости в течение 2 минут.

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

4. Пропустите 20 мл фильтрата (эквивалентного 2,5 г образца) через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (или образец можно пропустить через колонку под действием силы тяжести). Медленная, стабильная скорость потока необходима для захвата токсина антителом.

5. Промойте колонку, пропустив через нее 10 мл фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) при скорости потока приблизительно 5 мл в минуту. Пропустите через колонку воздух для удаления остатков жидкости.

6. Элюируйте токсин из колонки при скорости потока 1 капля в секунду с помощью 1,5 мл 100% метанола и соберите в стеклянную пробирку. Для получения дополнительной информации см. раздел "Элюирование" в Инструкции по применению.

7. Выпарите элюат досуха на воздухе при температуре 60-70 °C.

8. Восстановите его в 1 мл 15% метанола. Перемешайте на вортексе в течение 20 секунд.

9. Внесите 100 мкл восстановленного элюата в систему ВЭЖХ.

**Специи**

Этот метод был испытан на ряде специй, включая паприку, порошок чили и черный перец.

1. Взвесьте 25 г измельченного образца в устойчивом к растворителям блендере объемом 1 л.

2. Добавьте 200 мл воды и смешивайте на высокой скорости в течение 2 минут.

3. Отфильтруйте образец через фильтровальную бумагу Whatman No. 113 или No. 4 или центрифугировать при 4 000 об/мин в течение 10 минут.

4. Отрегулировать до pH 7,4 с помощью 2 M гидроксида натрия.

5. Пропустить 10 мл фильтрата (эквивалентно 1,25 г образца) через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (или образец может пройти через колонку под действием силы тяжести). Медленная, стабильная скорость потока необходима для захвата токсина антителом.

6. Промойте колонку, пропустив через нее 10 мл 1% Tween 20 в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) при скорости потока приблизительно 5 мл в минуту. Пропустите через колонку воздух для удаления остатков жидкости.

7. Элюируйте токсин из колонки при скорости потока 1 капля в секунду с помощью 1,5 мл 100 % метанола и соберите в стеклянную пробирку. Для получения дополнительной информации см. раздел "Элюирование" в инструкции по применению.

8. После элюирования пропустите через колонку 8,5 мл воды и соберите в ту же пробирку, чтобы получить общий объем 10 мл.

9. Введите 100 мкл в систему ВЭЖХ.

**Паста**

1. Взвесьте 25 г измельченного образца в устойчивом к растворителям блендере объемом 1 л.

2. Добавьте 200 мл воды и смешивайте на высокой скорости в течение 2 минут.

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

4. Пропустите 10 мл фильтрата (эквивалентного 1,25 г образца) через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (или образец может пройти через колонку под действием силы тяжести, если это предпочтительнее). Медленная, стабильная скорость потока необходима для захвата токсина антителом.

5. Промойте колонку, пропустив через нее 10 мл фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) при скорости потока приблизительно 5 мл в минуту. Пропустите через колонку воздух для удаления остатков жидкости.

6. Элюируйте токсин из колонки при скорости потока 1 капля в секунду с помощью 1,5 мл 100% метанола и соберите в стеклянную пробирку. Для получения дополнительной информации см. раздел "Элюирование" в Инструкции по применению.

7. Выпарите элюат досуха на воздухе при температуре 60-70 °C.

8. Восстановите его 1 мл 15% метанола. Перемешайте на вортексе в течение 20 секунд.

9. Внесите 100 мкл восстановленного элюата в систему ВЭЖХ.

**Овес**

1. Взвесьте 25 г измельченного образца и 8 г полиэтиленгликоля (ПЭГ) в устойчивом к растворителям блендере объемом 1 л. Добавьте 200 мл воды и смешивайте на высокой скорости в течение 2 минут.

2. Профильтруйте образец через фильтровальную бумагу Whatman № 113 или № 4, или центрифугируйте при 4 000 об/мин в течение 10 минут.

3. Пропустите 10 мл фильтрата (эквивалентного 1,25 г образца) через колонку со скоростью потока 2 мл в минуту (или образец может пройти через колонку под действием силы тяжести). Медленная, стабильная скорость потока необходима для захвата токсина антителом.

4. Промойте колонку, пропустив через нее 10 мл фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) при скорости потока приблизительно 5 мл в минуту. Пропустите через колонку воздух, чтобы удалить остатки жидкости.

5. Элюируйте токсин из колонки со скоростью потока 1 капля в секунду с помощью 1,5 мл 100% метанола и соберите в стеклянную пробирку. Для получения дополнительной информации см. раздел "Элюирование" в Инструкции по применению.

6. Выпарите элюат досуха на воздухе при температуре 60-70 °C.

7. Замените 1 мл 15 % метанола. Перемешайте на вортексе в течение 20 секунд.

8. Введите 100 мкл восстановленного элюата в систему ВЭЖХ.

**Подготовка стандартов**

Приготовление стокового раствора дезоксиниваленола в концентрации 100 нг/мл:

1. Можно приобрести кристаллический порошок дезоксиниваленола. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному дистрибьютору R-Biopharm. Порошок восстанавливают в соответствии с прилагаемыми инструкциями и оставляют на ночь в темноте при комнатной температуре, чтобы получить исходный концентрат.

2. Затем из этого раствора готовится исходный раствор дезоксиниваленола в концентрации 100.000 нг/мл.

**Калибровочная кривая**

Рекомендуется строить калибровочную кривую с использованием как минимум 3 – 6 точек. Диапазон калибровочных стандартов должен включать значения ожидаемых результатов. Растворы стандартов должны быть приготовлены непосредственно в день анализа и использоваться в течение 24 часов.

Пример как построить калибровочную кривую, основанную на 6 точках (кривая может быть модифицирована в соответствии с принятыми требованиями или уровнем контаминации):

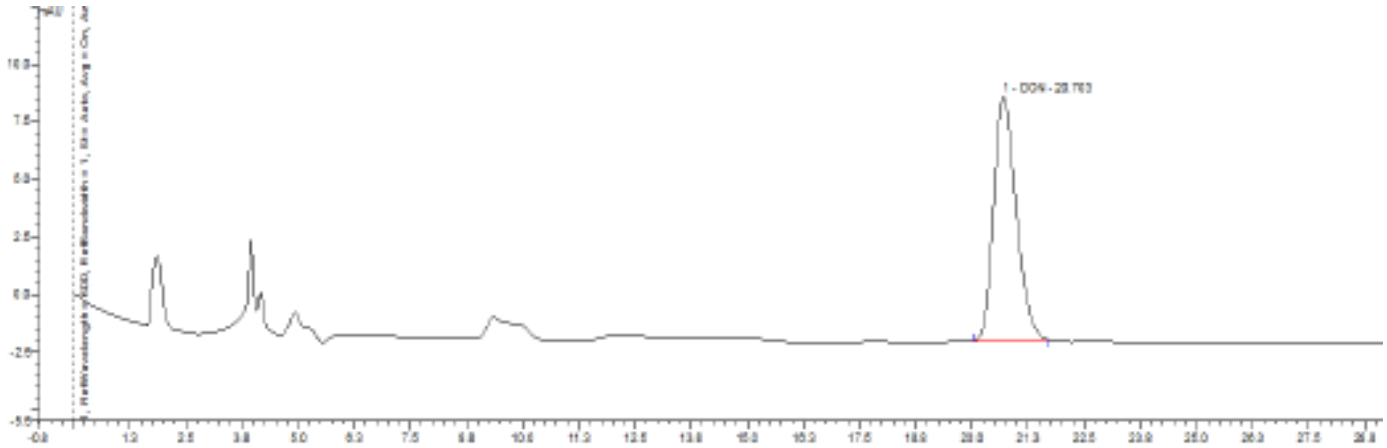
1. Добавьте 200 мкл восстановленного кристаллического стандарта к 800 мкл 100 %-ого ацетонитрила (эквивалентно 20 000 нг/мл).
2. Выпарите 200 мкл раствора до сухости на воздухе при температуре 60 – 70 °C.
3. Стандарт 6: Восстановите 2 мл 15 %-ого метанола (эквивалентно 2 000 нг/мл).
4. Стандарт 5: Отберите 1 мл 2 000 нг/мл и добавьте 1 мл 15%-ого метанола (эквивалентно 1 000 нг/мл).
5. Стандарт 4: возьмите 1 мл 1 000 нг/мл и добавьте 1 мл 15%-ого метанола (эквивалентно 500 нг/мл).
6. Стандарт 3: возьмите 1 мл 500 нг/мл и добавьте 1 мл 15%-ого метанола (эквивалентно 250 нг/мл).
7. Стандарт 2: возьмите 1 мл 250 нг/мл и добавьте 1 мл 15%-ого метанола (эквивалентно 125 нг/мл).
8. Стандарт 1: возьмите 1 мл 125 нг/мл и добавьте 1 мл 15%-ого метанола (эквивалентно 62,5 нг/мл).
9. Введите 100 мкл каждого раствора в систему ВЭЖХ.

**Рекомендуемые условия ВЭЖХ**

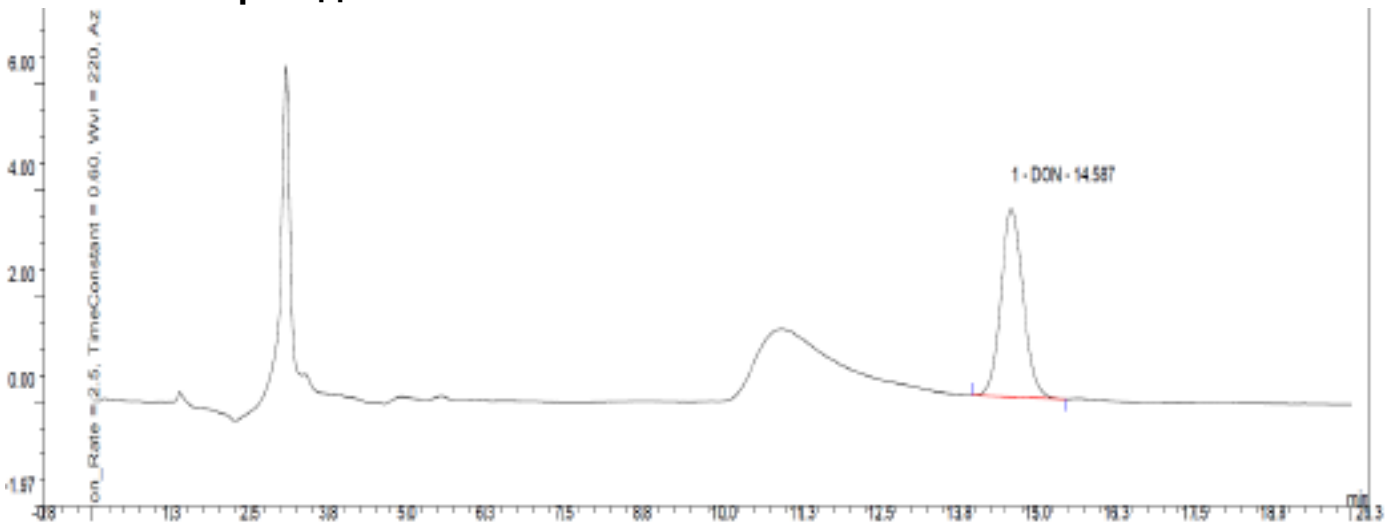
| Условия ВЭЖХ | | | |
|---|---|---|---|
| Защитный картридж (Guard Cartridge) | AQUASIL C18<br>3 мкм, 4 mm × 10 mm или эквивалентный | | |
| Аналитическая колонка | AQUASIL C18<br>3 мкм, 4.6 мм × 150 мм или эквивалентная | | |
| Мобильная фаза | Раствор А: Вода<br>Раствор В: Метанол<br>Готовить в день анализа | | |
| Условия градиента | Время (мин) | Раствор А, % | Раствор В, % |
| | 0 | 85 | 15 |
| | 25 | 85 | 15 |
| | 26 | 50 | 50 |
| | 30 | 50 | 50 |
| | 31 | 85 | 15 |
| | 40 | 85 | 15 |
| Насос ВЭЖХ | Для доставки мобильной фазы | | |
| Скорость потока | 0,4 мл/мин | | |
| УФ детектор | 220 нм | | |
| Нагреватель колонки | Поддерживающий картридж (maintain guard) и аналитическую колонку выдержать при 30°C | | |
| Интегратор/Система управления данных | По предпочтению потребителя | | |
| Инжектор | Автосамплер/клапан Rheodyne | | |
| Вводимый объем | 100 мкл | | |

**Примеры ВЭЖХ хроматограммы для анализа дезоксиниваленола с использованием иммуноаффинных колонок DONPREP®:**

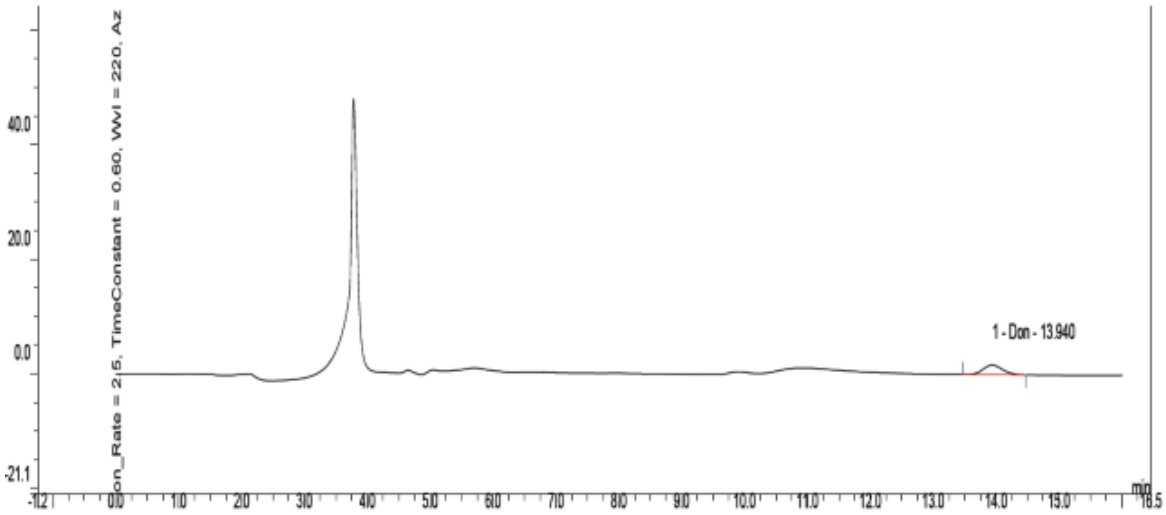
- **Злаковые**



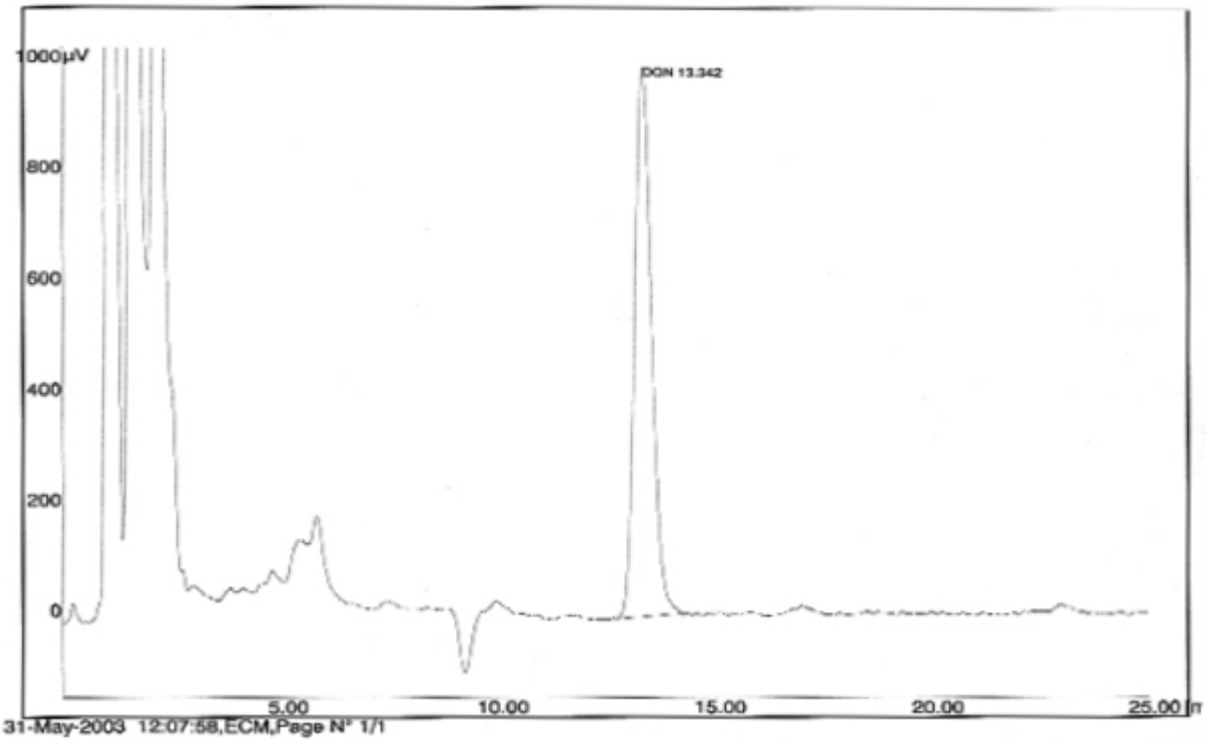
- **Корма для животных**



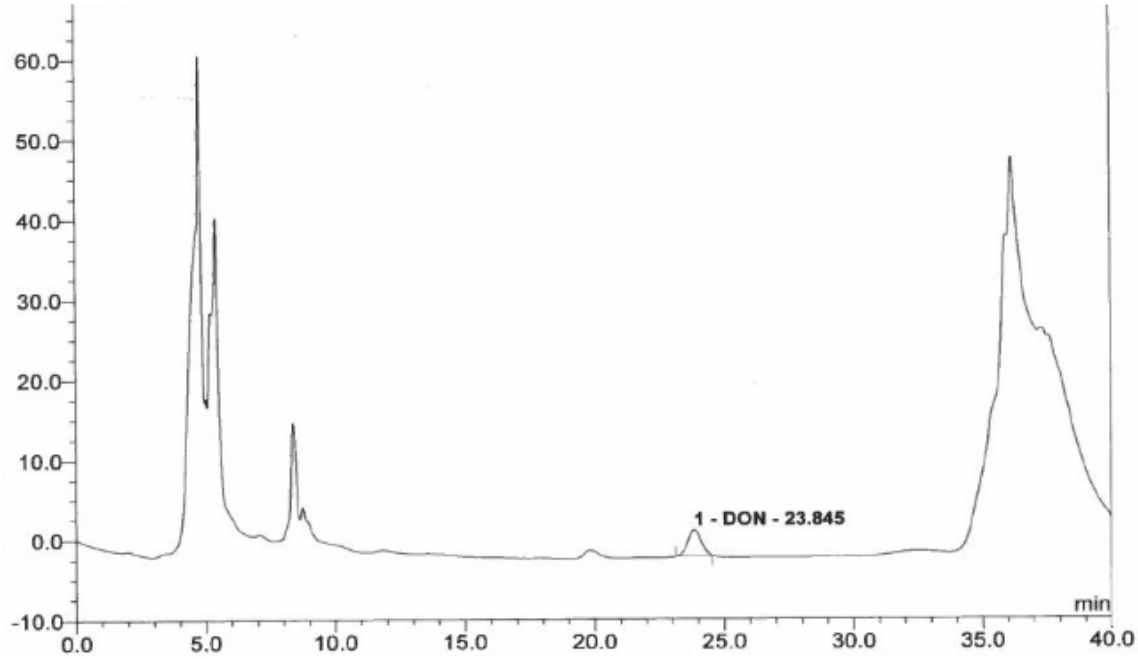

- **Пиво**



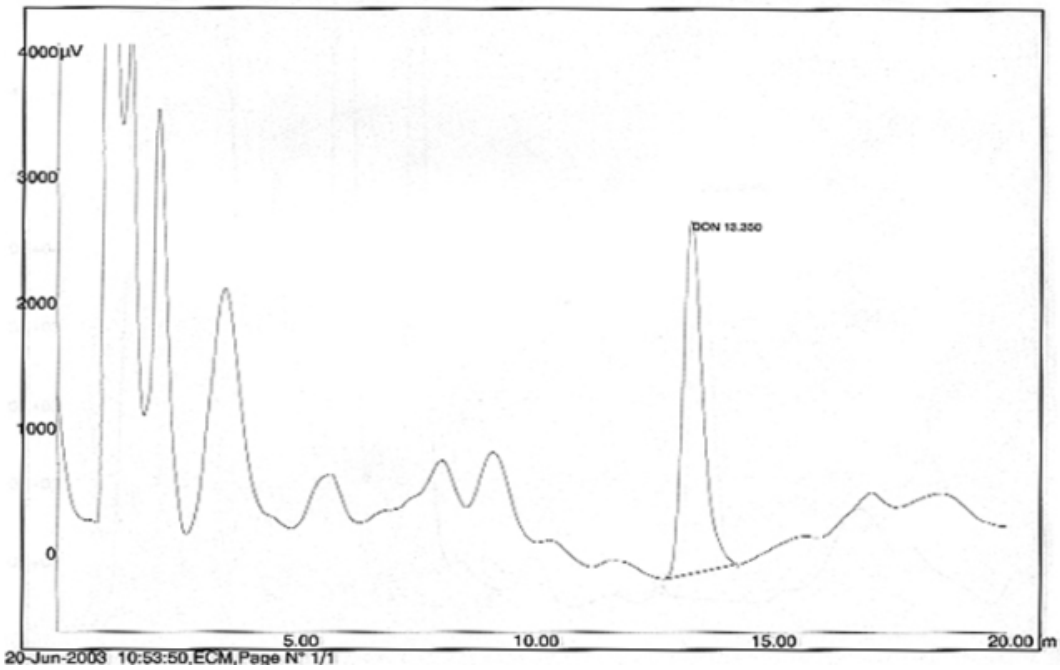
- **Детское питание (загрязнение на уровне 50 ppb)**



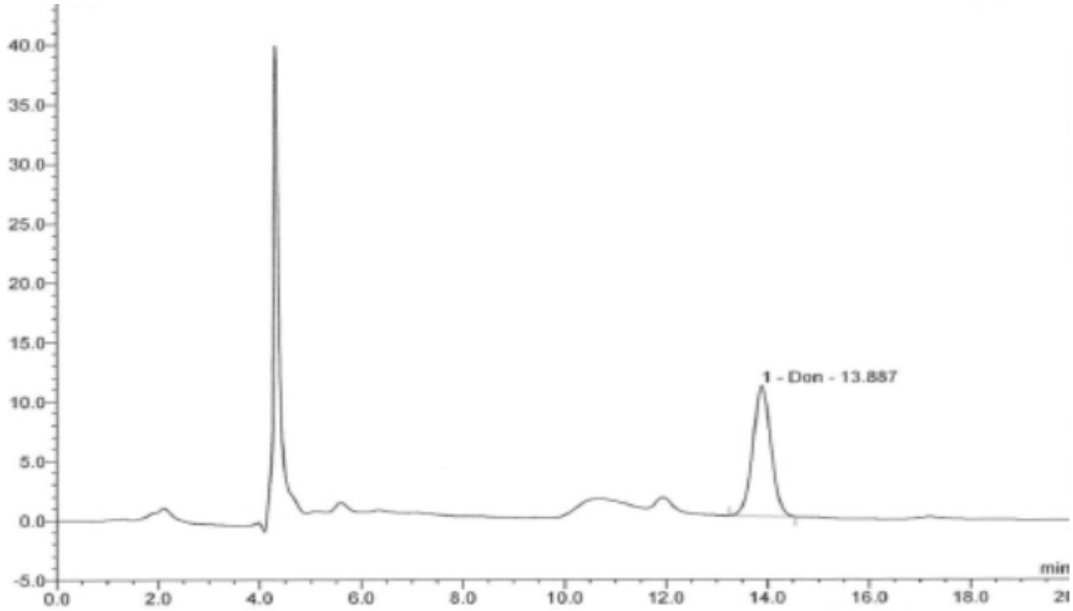

- **Паприка (загрязнение на уровне 500 ppb)**



- **Паста (загрязнение на уровне 375 ppb)**




- **Овес (загрязнение на уровне 100 ppb)**




**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 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.