EASI-EXTRACT® Афлатоксин

Арт. No. RP71 / RP70N

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

Только для использования *in vitro*

RP71RP70N/V17/30.06.21

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

EASI-EXTRACT® Афлатоксин

Принцип работы

Метод очистки афлатоксина основан на использовании моноклональных антител, которые обеспечивают высокую специфичность, чувствительность, скорость и простоту выполнения процедуры. Колонка содержит гель, насыщенный моноклональными антителами специфичными в отношении афлатоксинов. Афлатоксины экстрагируются из образца, фильтруются, разводятся и медленно пропускаются через иммуноаффинную колонку. Афлотоксины, присутствующие в образце, задерживаются антителами и остаются внутри геля. Колонка промывается для удаления не связавшихся компонентов, затем афлатоксины элюируются из колонки растворителем. Далее элюат анализируют ВЭЖХ или ЖХ-МС/МС. Афлаткосины должны быть дериватизированны перед проведением ВЭЖХ.

Процедура экстракции и очистки занимает примерно 20 минут. Результат – высокая чистота и концентрация токсинов, экстрагированных из пищи и кормов, 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 (HPLC grade метанол);
- фосфатно-солевой буфер (ФСБ, RP202*);
- стандарт афлатоксина (см. раздел подготовка стандартов);
- хлорид натрия;
- гидроксид натрия (для доведения pH, если потребуется);
- азотная кислота (необходима только в случае проведения дериватизации с использованием KOBRA®CELL);
- бромид калия (необходим только в случае проведения дериватизации с использованием KOBRA®CELL).

Вспомогательные материалы

- Whatman № 113 или фильтровальная бумага № 4;
- KOBRA®CELL (K01*);
- стойка для иммуноаффинных колонок (CR1*);
- набор аксессуаров 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 Листков безопасности (MSDS) свяжитесь с местным дистрибьютером 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. 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, как минимум 1 кг представленного образца измельчить и отобрать порцию (10-50 г в зависимости от используемого метода) для экстракции.

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. Пожалуйста, обратите внимание, что необходимо поддерживать соотношение растворителя и ФСБ.

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

Элюция

Для полного удаления токсина из иммуноаффинной колонки необходимо, что бы растворитель контактировал с антителами, расположенными внутри геля колонки, достаточный период времени. Это гарантирует разрушение всех связей между антителами и молекулами токсина и, следовательно, полное извлечение связанного токсина.

Для увеличения времени контакта растворителя и геля можно использовать следующие методы:

Обратная промывка (метод рекомендуемый производителем): Обратная промывка выполняется путем аккуратного нажатие и вытягивания поршня шприца при пропускании растворителя через колонку. Направление этого процесса будет обратным направлению движения элюата. Обратную промывку нужно повторить три раза.

Использование малых объемов растворителя: разделите объем растворителя, наносимый для элюирования, на две или три части (аликвоты). Пусть каждая аликвота остается в контакте с гелевой суспензией в течение

как минимум 30 секунд, прежде чем дать растворителю пройти через гель. Перейдите к следующему шагу в выполнении метода.

Инкубация с растворителем: нанесите растворитель, в объеме необходимом для элюирования, дайте 2-3 каплям растворителя пройти через колонку. Пусть оставшийся растворитель остается в контакте с гелевой суспензией в течение как минимум 60 секунд, прежде чем дать ему возможность пройти через гель. Перейдите к следующему шагу в выполнении метода.

Пробоподготовка

- зерновые

Метод был протестирован на большом количестве зерновых, включая пшеницу, ячмень, маис.

1. Взвесьте 50 г измельченного образца и 5 г хлорида натрия в емкости блендера объемом 1 л, резистентной к действию растворителя.
2. Добавьте 100 мл 80% метанола и перемешайте на большой скорости в течение 2 минут.
3. Профильтруйте образец через Whatman № 113 или фильтровальную бумагу № 4 или центрифугируйте при 4000 об/мин в течение 10 мин.
4. Разбавьте 2 мл фильтрата 14 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ).
5. Пропустите фильтрат (эквивалентный 1 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 ФСБ 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 % метанола и соберите элюат в темную стеклянную емкость. Пожалуйста, обратитесь к разделу инструкции «Элюция» для получения полной информации.
8. Далее, в процессе элюции, пропустите через колонку 1,5 мл воды и соберите элюат в туже емкость. Общий объем элюата составит 3 мл.
9. Введите 100 мкл элюата в HPLC систему.

- орехи

Метод был протестирован на большом количестве орехов, включая фисташки, арахис, миндаль, бразильский и грецкий орехи.

1. Взвесьте 50 г измельченного образца и 5 г хлорида натрия в емкости блендера объемом 1 л, резистентной к действию растворителя.
2. Добавьте 100 мл воды и перемешайте на большой скорости в течение 1 минут.
3. Добавьте 150 мл 100% метанола и перемешайте на большой скорости в течение 2 минут.

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

5. Доведите pH раствора до 7,4 используя 2 М гидроксид натрия.

6. Разбавьте 5 мл фильтрата 5 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ).

7. Пропустите фильтрат (эквивалентный 1 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.

8. Промойте колонку, пропуская через нее 20 мл ФСБ при скорости потока 5 мл/мин. Пропустите через колонку воздух для удаления остатков жидкости.

9. Элюируйте токсин из колонки при скорости потока 1 капля/сек используя 1,5 мл 100 % метанола и соберите элюат в темную стеклянную емкость. Пожалуйста, обратитесь к разделу инструкции «Элюция» для получения полной информации.

10. Затем, пропустите через колонку 1,5 мл воды и соберите элюат в туже емкость. Общий объем элюата составит 3 мл.

11. Введите 100 мкл элюата в ВЭЖХ систему.

Подготовка стандартов

Приготовление стокового раствора афлатоксинов G2, G1, B2, B1 в концентрации 1000 нг/мл:

1. Готовый к использованию стандарт ALFASTANDARD (P22/P22A, 1000 нг/мл) доступен в R-Biopharm.

2. Также можно приобрести кристаллический порошок афлатоксинов G2, G1, B2, B1. Для этого свяжитесь с местным дистрибьютором R-Biopharm для получения дальнейшей информации. Порошок необходимо подготовить в соответствии с инструкцией и оставить в темноте при комнатной температуре для получения раствора стоковой концентрации.

3. Полученный раствор можно использовать для приготовления раствора содержащего G2, G1, B2, B1 в концентрации 1000 нг/мл.

Примечание: обратите внимание, что соотношение G2, G1, B2, B1 может варьировать в каждом стандарте.

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:

1.Стандарт 4: возьмите 80 мкл раствора суммарного афлатоксина 1000 нг/мл и доведите до 2 мл 50% метанолом (раствор с концентрацией 40 нг/мл).

2.Стандарт 3: возьмите 1 мл раствора суммарного афлатоксина 40 нг/мл и добавьте 1 мл 50% метанола (раствор с концентрацией 20 нг/мл).

3.Стандарт 2: возьмите 1 мл раствора суммарного афлатоксина 20 нг/мл и добавьте 1 мл 50% метанола (раствор с концентрацией 10 нг/мл).

4.Стандарт 1: возьмите 400 мкл раствора суммарного афлатоксина 10 нг/мл и доведите до 2 мл 50% метанолом (раствор с концентрацией 2 нг/мл).

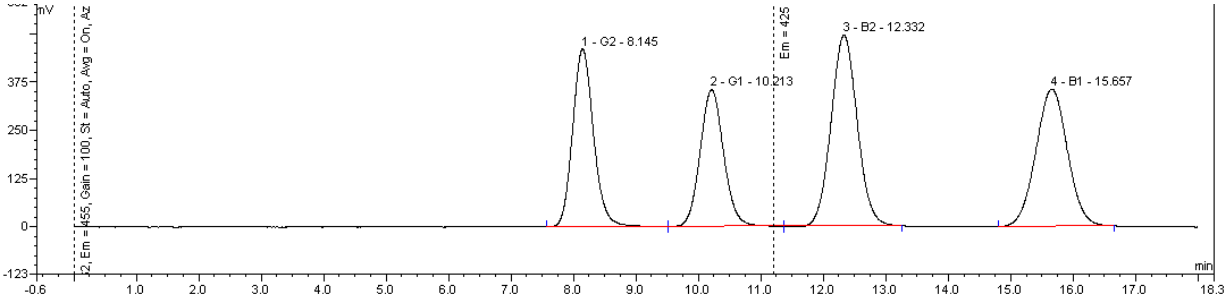
5.Введите 100 мкл каждого стандарта в HPLC хроматограф. После дериватизации в KOBRA®CELL порядок элюции следующий: G2, G1, B2, B1.

Рекомендуемые условия ВЭЖХ

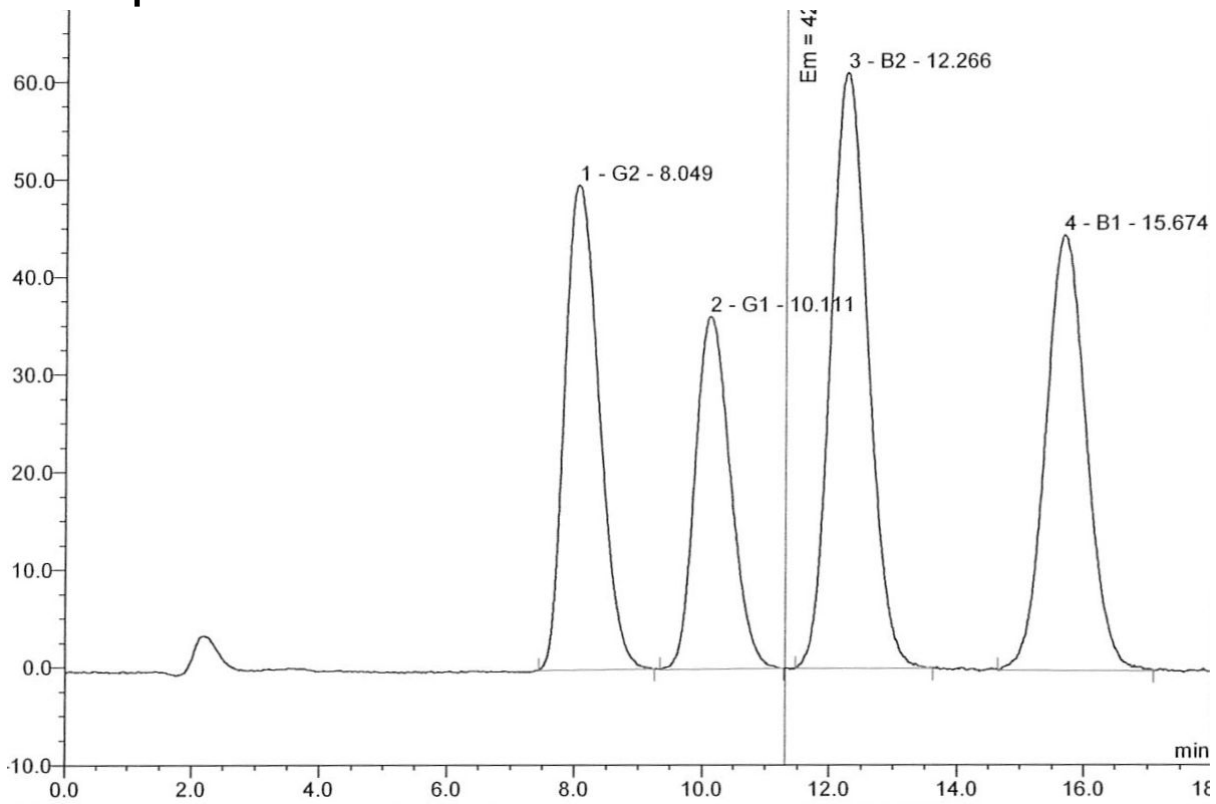
Условия ВЭЖХ	
Дериватизация	COBRA®CELL при настройке 100 µA
Защитный картридж (Guard Cartridge)	Inertsil ODS-3 5 мкм, 4 мм x 10 мм (Hichrom) или эквивалентный
Аналитическая колонка	Inertsil ODS-3V 5 мкм, 4.6 мм x 150 мм (Hichrom) или эквивалентная
Мобильная фаза	Вода : Метанол (60 : 40 объем/объем) Добавить 119 мг бромида калия и 350 мкл 4 М азотной кислоты в 1 л мобильной фазы. Приготовить в день анализа.
Насос HPLC	Для доставки мобильной фазы
Скорость потока	1,0 мл/мин
Флуоресцентный детектор	Возбуждение: 362 нм
	Испускание: 425 нм (B1 и B2) 455 нм (G1 и G2)
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 афлатоксинов	G2, G1, B2, B1

Пример HPLC хроматограммы с использованием иммуноаффинной колонки EASI-EXTRACT® AFLATOXIN:

- **Злаковые**



- **Орехи**



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.